SYNTHESE UND BIOLOGISCHE EFFEKTE SUBSTITUIERTER GUANIDINOVERBINDUNGEN: INSULINÄHNLICHE WIRKUNGEN UND CYTOSTATISCHE EIGENSCHAFTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
EKKEHARD HOCHSCHILD
aus Karlsruhe

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SYNTHESE UND BIOLOGISCHE EFFEKTE SUBSTITUIERTER GUANIDINOVERBINDUNGEN: INSULINÄHNLICHE WIRKUNGEN UND CYTOSTATISCHE EIGENSCHAFTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
EKKEHARD HOCHSCHILD
aus Karlsruhe

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	2. März 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Eisele

Abstract

HOCHSCHILD, EKKEHARD:

SYNTHESE UND BIOLOGISCHE EFFEKTE SUBSTITUIERTER GUANIDINO-VERBINDUNGEN: INSULINÄHNLICHE WIRKUNGEN UND CYTOSTATISCHE EIGENSCHAFTEN

Folgende Verbindungen werden synthetisiert: 4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid; 5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid; 6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid; 11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid; 1-Guanidino-3-phenylpropan; 1-Guanidino-4-phenylbutan; Arg-Gly-Phe-Phe-dimethylamid; N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly; N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Phe; N^{α},N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-Arg; N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly-Arg; N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Phe-Arg. Die an Phenylalanindimethylamid gekoppelten ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen und ihre Analoga werden in folgenden Testsystemen auf insulinähnliche Wirkungen untersucht: Glucose-Oxidation in isolierten Fettzellen des epididymalen Fettgewebes der Ratte; Glucose-Aufnahme in Diaphragma und Fettgewebe der Maus; Blutglucose-Bestimmung der Maus. 1-Guanidino-3-phenylpropan zeigt in allen Testsystemen signifikante Effekte, ebenso 1-Guanidino-4-phenylbutan mit Ausnahme der Blutglucose-Senkung. Im Falle der Glucoseoxidation ist ihr Verhalten der Insulinwirkung entgegengesetzt. Von den ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen weisen nur 5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid und 6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid sowie das Tetrapeptid bei der Glucoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe biologische Aktivitäten auf. Die restlichen Verbindungen verhalten sich indifferent.

Die chlorethylierten Aminosäuren und Dipeptide werden in Ascitestzellen des Ehrlich-Ascitescarcinoms (flüssig) auf cytostatisches Verhalten geprüft. Das bischlorethylierte Arg zeigt im Vergleich zu den bischlorethylierten Aminosäuren Gly und Phe beschleunigte Hemmeffekte bei gleicher alkylierender Aktivität. Bei den bischlorethylierten Dipeptiden Gly-Arg und Phe-Arg wird die Hemmwirkung verzögert wirksam.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536512_0021

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Diese Arbeit wurde am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. U. Weber danke ich dafür, daß ich nach Ausscheiden von Prof. Weitzel die Arbeit unter seiner Leitung fortführen konnte.

Zu Dank verpflichtet bin ich ferner den Service-Abteilungen des Physiologisch-chemischen Instituts für die Anfertigung der Elementaranalysen, Herrn Dr. Sarrazin für die Ausführung einiger biologischen Tests, Herrn Dr. Jung für wertvolle Hinweise und Unterstützung bei den Tierversuchen sowie Prof. Dr. K. Eisele für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinem Laborkollegen Herrn Dr. Quack für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei den Tierversuchen.

Abkürzungen

Die Abkürzungen der Aminosäuren und ihrer Derivate richten sich nach den von der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur veröffentlichten Regeln (38,39).

Arg	= L-Arginin
Gly	= Glycin
Phe	= L-Phenylalanin
Boc	= N-tert.-Butyloxycarbonyl
OMe	= Methylester
ONp	= p-Nitrophenylester
Z	= Benzyloxycarbonyl
Z(OMe)	= p-Methoxybenzyloxycarbonyl

Darüber hinaus werden folgende Abkürzungen verwendet:

ButOH	= n-Butanol
CboCl	= Benzyloxycarbonylchlorid
DCCI	= Dicyclohexylcarbodiimid
DMA	= Dimethylamin
DMF	= Dimethylformamid
DPF	= 3,5-Dimethylpyrazolyl-formamidiniumnitrat
EE	= Essigsäureethylester
EtOH	= Ethanol
GOD	= Glucoseoxidase EC 1.1.3.4
HEPES	= 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

Hyamine	= p-(Diisobutyl-kresoxy-ethoxy-ethyl)-dimethylbenzylammonium-hydroxid
HOAc	= Essigsäure
HOBt	= 1-Hydroxy-benzotriazol
MeOH	= Methanol
NBP	= 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin
Pd/C	= Palladium/Aktivkohle-Katalysator
PE	= Petrolether
POD	= Peroxidase EC 1.11.1.7
POPOP	= 2,2-p-Phenylen-bis-5-phenyloxazol
PPO	= 2,5-Diphenyloxazol
TÄA	= Triethylamin
TCA	= Trichloressigsäure
TFA	= Trifluoressigsäure
THF	= Tetrahydrofuran
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Z(OMe)-Azid	= Azidoameisensäure-4-methoxy-benzylester
cpm	= Zählimpulse pro Minute

Inhaltsverzeichnis

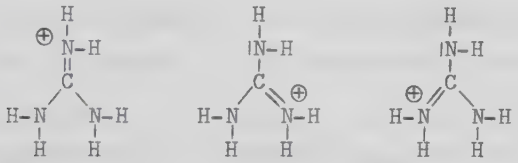
		Seite
1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe	9
2.2.	Geräte	11
2.3.	Analytische Methoden	11
2.4.	Darstellung der Verbindungen	13
2.4.1.	ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen und Analoga	13
2.4.2.	Chlorethylierte Verbindungen	15
2.5.	Biologische Meßmethoden	17
2.5.1.	Tests für ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen und Analoga	17
2.5.2.	In-vitro-Test für chlorethylierte Verbindungen	20
3.	BESCHREIBUNG DER SYNTHESEN	21
3.1.	ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen und Analoga	21
3.1.1.	4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid	22
3.1.2.	5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid	26
3.1.3.	6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid	30
3.1.4.	11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid	34
3.1.5.	1-Guanidino-3-phenylpropan	38
3.1.6.	1-Guanidino-4-phenylbutan	38
3.1.7.	L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanin-dimethylamid	39
3.2.	Chlorethylierte Verbindungen	49
3.2.1.	Schutzgruppen an Arginin	49
3.2.2.	N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycin	55
3.2.3.	N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycyl-L-arginin	57
3.2.4.	N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanin	60
3.2.5.	N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanyl-L-arginin	61
3.2.6.	N^{α},N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-arginin	62

		Seite
4.	BESCHREIBUNG DER BIOLOGISCHEN TESTS	65
4.1.	Tests für ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen	65
4.1.1.	Glucoseoxidation an isolierten Fettzellen des epididymalen Fettgewebes der Ratte	65
4.1.2.	In-vivo-Messungen der Glucoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe der Maus	68
4.1.3.	Blutzuckerbestimmung der Maus	69
4.2.	In-vitro-Test für chlorethylierte Verbindungen	70
5.	ERGEBNISSE	75
5.1.	Synthesen der Verbindungen	75
5.1.1.	ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen und Analoga	75
5.1.2.	Chlorethylierte Verbindungen	77
5.2.	Biologische Tests	82
5.2.1.	Tests für ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen und Analoga	82
5.2.2.	Test für chlorethylierte Verbindungen	91
6.	DISKUSSION	104
6.1.	Synthesen	104
6.2.	Biologische Tests	110
7.	ZUSAMMENFASSUNG	117
8.	LITERATURVERZEICHNIS	119

Lebenslauf

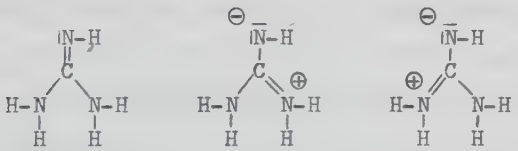
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Guanidino-Gruppe, die eine wichtige Funktion im Stickstoffmetabolismus einnimmt, läßt sich aus der Grundverbindung Guanidin ableiten, welches die stärkste bekannte organische Base darstellt. Seine Basizität, die nahezu an die der Alkalihydroxide heranreicht, beruht auf der Ausbildung von drei völlig gleichartigen Grenzstrukturen des Guanidinium-Ions:



Guanidinium-Ion

Im Gegensatz dazu besteht beim Guanidin selbst diese Möglichkeit nicht:



Guanidin

Der Unterschied in den Resonanzenergien bestimmt die hohe Basenstärke (1).

In Mono- und Dialkyl-Guanidinen ist die Resonanz im Vergleich zum Guanidin weniger ausgeprägt, da der Kohlenstoff elektronegativer als der Wasserstoff ist. Demzufolge nimmt die Basizität ab und nähert sich der von Amidinen. Das bedeutet aber, daß die Guanidino-Gruppen mit pK-Werten um 12,5 bei physiologischem pH in geladenem Zustand vorliegen müssen. Ein solches Guanidinium-Kation kann nun mit einem oder mehreren negativ geladenen Gruppen in eine Wechselwirkung treten, die teils elektrostatischer Natur sein kann, teils auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beruht. In biologischem Material kom-

men dafür vorwiegend Carboxyl- und Phosphat-Gruppen in Betracht. So weisen z.B. die Substrate aller Enzyme, in denen Arginin als essentieller Bestandteil des aktiven Zentrums nachgewiesen werden konnte, anionischen Charakter auf (2). Besonders deutlich zeigt sich dieser Zusammenhang bei den Enzymen der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Zyklus. Außer der Lactatdehydrogenase bzw. der Alkoholdehydrogenase, die einen anionischen Cofaktor NAD(H) benötigen, setzen sämtliche Enzyme der Glykolyse phosphorylierte Substrate um. Im Falle des Pentose-Phosphat-Zyklus liegen alle Substrate als Phosphorsäureester vor.

Aufgrund der Funktion der Guanidino-Gruppe als Anionenerkennungs- und Bindungsort in Enzymen mit essentiellen Arginin-Resten (3) konnte erwartet werden, daß auch schon freie, niedermolekulare Guanidino-Verbindungen mehr oder weniger deutliche Effekte im Zuckermetabolismus zeigten. So wurden schon 1918 hypoglykämische Aktivitäten des Guanidins nachgewiesen (4). Systematische Untersuchungen in den 20er Jahren an alkylierten Guanidinen ergaben, daß bei zusätzlicher Einführung einer basischen Gruppe, wie z.B. beim Agmatin $H_2N-C(=NH)-NH-(CH_2)_4-NH_2$, wesentlich höhere Aktivitäten als beim Guanidin auftraten (5). Eine nochmalige Steigerung hinsichtlich der blutzuckersenkenden Eigenschaften wurde erreicht, wenn anstelle einer Aminogruppe eine zweite Guanidinogruppe eingeführt wurde. 1,10 -Diguanidinodekan bzw. 1,12-Diguanidinododekan wurden unter dem Namen Synthalin A bzw. B sogar als orale Antidiabetika eingesetzt.

Schwächere hypoglykämische Effekte als bei den Diguanidino-Verbindungen ließen sich erzielen, wenn alkylierte Monoguanidinoverbindungen mit einer Carboxyl-Gruppe versehen wur-

den (6). Voraussetzung dafür war jedoch, daß die Carboxyl-Gruppe verschlossen vorlag, d.h. als Carbonsäureester oder Carbonsäureamid.

Ausgehend von diesen Befunden und im Rahmen der Untersuchung, inwieweit das Arginin in Position 22 der B-Kette des Insulins essentiell für dessen biologische Wirksamkeit ist, wurden in der Tübinger Arbeitsgruppe von Prof. WEITZEL und Mitarbeitern systematisch drei Verbindungsklassen auf insulinähnliche Effekte (Glucose-Oxydation in Fettzellen, Glucose-Aufnahme in Muskel und Fettgewebe, Blutzuckersenkung) überprüft:

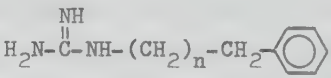
1) Arginylfreie Guanidinoverbindungen, insbesondere ω-Guanidinocarbonsäure-Derivate verschiedener Kettenlängen (C_5 - C_{12}). Sie zeigten bei Kettenlängen von C_8 - C_{12} in steigendem Maße blutzuckersenkende Effekte (insulin-ähnlich) während sich C_5- und C_6-Derivate indifferent verhielten. Parallel dazu wurde die Glucose-Oxydation in Fettzellen erniedrigt, was auf eine Hemmung des Pentose-Phosphat-Zyklus schließen ließ (der Insulin-Wirkung entgegengesetzt). Voraussetzung für die biologischen Aktivitäten war jedoch eine nichtunterbrochene Polymethylen-Kette (7). So erwies sich Succinyl-Agmatin (4-(4-Guanidinobutylamino)-4-oxobuttersäure) als völlig indifferent (8 - 10).

2) Homologe und Derivate von Arginin. Sie zeigten keine hypoglykämischen Aktivitäten, während sie sich bei den anderen Effekten entweder indifferent oder in Übereinstimmung mit der Wirkungsrichtung des Insulins verhielten (11 - 15).

3) Oligopeptide mit aminoendständigem Arginin, von denen besonders das Tetrapeptid Arg-Gly-Phe-Phe-amid, als Partialsequenz der B-Kette des Insulins (Position 22 - 25) in Muskel und isolierten Fettzellen Insulin-Aktivität zeigte (16-23).

Bei Betrachtung der unterschiedlich ausgeprägten biologischen Effekte arginylfreier Guanidinoverbindungen nach Einführung einer zusätzlichen funktionellen Gruppe sowie bei unterschiedlichen Kettenlängen stellte sich die Frage, ob sich die Wirkungen solcher Verbindungen auch nach Verknüpfung mit einer apolaren, hydrophoben Gruppe, wie z.B. dem Phenyl- oder Benzylrest, verändern. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Unterbrechung der Methylenkette durch Peptidbindungen bei den ω-Guanidinocarbonsäuren, mit sonst analoger Kettenlänge, generell zum Verlust der biologischen Aktivitäten führt.
Der erste Teil dieser Arbeit befaßt sich daher mit der Synthese und den biologischen Aktivitäten folgender Verbindungen:

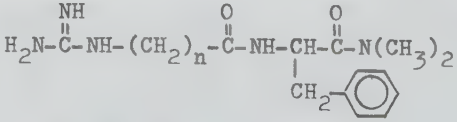
I. Guanidinoverbindungen mit einem zusätzlichen Benzylrest:



n = 2 : 1-Guanidino-3-phenylpropan

= 3 : 1-Guanidino-4-phenylbutan

II. Guanidinoverbindungen mit einer geschlossenen Carboxylgruppe, einem Benzylrest in α-Stellung und einer Peptidbindung:



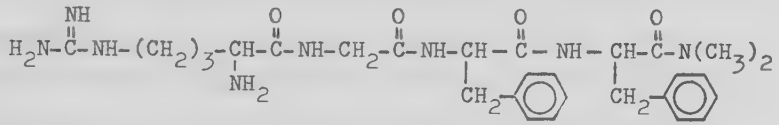
n = 3 : 4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid

= 4 : 5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid

= 5 : 6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindemethylamid

= 10: 11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid

III. Das Tetrapeptid Arg-Gly-Phe-Phe-dimethylamid. Es handelt sich hierbei um die Partialsequenz aus Position 22 - 25 der Insulin-B-Kette mit carboxylendständigem Dimethylamid. Als solches wurde es bisher noch nicht auf biologische Aktivitäten untersucht. Formal ist es von gleicher "Kettenlänge" wie das 11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanin-dimethylamid.



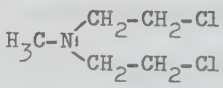
Die Untersuchungen der biologischen Aktivitäten der dargestellten Verbindungen erstrecken sich auf die Messung der Glucose-Oxydation in isolierten epididymalen Fettzellen der Ratte, der Glucose-Aufnahme in Fettzellen und Diaphragma der Maus sowie auf die Blutzuckerbestimmung bei Mäusen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen biologische Effekte der Guanidino-Gruppe in Verbindung mit alkylierenden, cytotoxischen Gruppen untersucht werden.
Wie eingangs schon ausgeführt, ist die Guanidino-Gruppe wegen ihrer planaren Struktur wie keine andere funktionelle Gruppe in der Lage, über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken spezifische Bindungen mit Phosphatresten einzugehen (24). Dies ist vor allem auch der Fall mit den polyanionischen DNA- und RNA-Strängen. So weisen z.B. auch alle experimentellen Daten darauf hin, daß die Bindung der DNA- und RNA-Polymerasen an die entsprechenden Polynucleotid-Stränge über die Guanidino-Gruppen des Arginins im aktiven Zentrum der Enzyme erfolgt. (25,26).

Angesichts der Tatsache, daß die meisten alkylierenden, cytotoxischen Verbindungen als Zielmoleküle bevorzugt die DNA und RNA angreifen stellt sich die Frage, ob solche Cytostatika in ihrer Wirkung durch Einführung der Guanidino-Gruppe, die ja gewisse Affinität gegenüber den Nucleinsäuren aufweist, verstärkt werden können.

Über cytotoxische Effekte von Verbindungen, welche biologisches Material unter physiologischen Bedingungen alkylieren können, wurde bereits Ende des vorigen Jahrhunderts berichtet (27,28). Bis heute sind Tausende solcher alkylierenden, das Zellwachstum hemmenden Substanzen synthetisiert worden (29). Man kann sie in verschiedene Klassen einteilen, z.B. 2-Chlorethylamine, Alkyl-alkansulfonate, Aziridine, Triazine, Nitrosoharnstoffe und Epoxide.

Die Vertreter vom 2-Chlorethylamin-Typ werden als die "klassischen alkylierenden Verbindungen" bezeichnet. Sie sind als Derivate des Stickstoff-Losts (Mechlorethamin) aufzufassen:



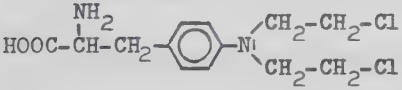
Stickstoff-Lost

Die beiden Chlorethyl-Gruppen sind dabei für die alkylierenden, cytotoxischen Wirkungen verantwortlich. Stickstoff-Lost selbst war mit unter den ersten Wirkstoffen, die signifikante Effekte an neoplastischen Zellen zeigten. In den vierziger Jahren wurde es sogar in der Tumor-Therapie eingesetzt.

Es zeigte sich jedoch bald, daß die Wirkung dieser alkylierenden Substanzen nicht spezifisch auf neoplastisches Gewebe beschränkt ist, sondern alle schnell proliferierenden Zellen betroffen sind (30).

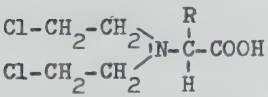
Auf der Suche nach Verbindungen, welche eine größere Spezifi-

tät gegenüber Tumorzellen besitzen, ging man daran, die Methyl-Gruppe des Stickstoff-Losts durch andere Reste zu ersetzen. Da die alkylierenden Stoffe die Zellmembran durchdringen müssen, war es folgerichtig, die verbleibende cytotoxische Gruppierung an solche "Carrier" anzuheften, die beim Zellwachstum eine Rolle spielen. Solche Strukturen waren natürlich vorkommende Aminosäuren, Kohlenhydrate, Nucleinsäuren und Steroide. Unter den Aminosäuren als Carrier wurden bisher Glycin, Alanin und bevorzugt Phenylalanin verwendet. Das von STOCK und Mitarbeitern (31) synthetisierte p-Bis-(2-chlorethyl)-aminophenylalanin (Phenylalanin-Lost) wurde neben Cyclophosphamid die am besten untersuchte alkylierende Verbindung mit Wirkungsspezifität auf neoplastisches Gewebe. Die L-Form ist bekannt geworden unter dem Namen Melphalan^{R} (32), das Racemat unter dem Namen Sarcolysin (33). Ihre tumorhemmende Wirkung und die mutagenen Effekte wurden ausführlich beschrieben (34-36).



Phenylalanin-Lost

Im Phenylalanin-Lost ist formal die Bis-(2-chlorethyl)-amin-Gruppe (N-Nor-Lost) in p-Stellung an den aromatischen Ring von Phenylalanin gebunden. Auf andere Weise führten IZUMI und Mitarbeiter die alkylierenden Chlorethyl-Gruppen in Aminosäuren ein, indem sie diese direkt an die α-Aminogruppen von Glycin und Alanin hefteten (37).



R = H

= CH_3

Auch bei diesen Verbindungen zeigten sich ausgeprägte cytotoxische Aktivitäten.

Auf der Suche nach Möglichkeiten zur Einführung der Guanidino-Funktion in solche N,N-bischlorethylierten Aminosäuren bietet sich das Arginin selbst als Träger der Guanidino-Gruppe an. Diese kann dabei auf zwei verschiedene Arten angebracht werden:

1. Indem Arginin selbst oder ein Homologes von Arginin an der α-Aminogruppe bischlorethyliert wird. Formal handelt es sich dabei um ω-Guanidinocarbonsäuren mit N-Nor-Lost in α-Stellung zur Carboxylgruppe.
2. Durch Kopplung einer N,N-bischlorethylierten Aminosäure an die α-Aminogruppe von Arginin oder seinen Homologen.

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßt sich daher mit der Synthese und der Prüfung auf cytostatische Wirksamkeit von folgenden Verbindungen:

I. N,N-bischlorethylierte Aminosäuren Glycin, Phenylalanin und Arginin

II. N,N-bischlorethylierte Dipeptide Gly-Arg und Phe-Arg

Die Prüfung auf cytostatische Wirksamkeit erfolgt in Zellen des EHRLICH-Ascites-Carcinoms (flüssig).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe

Glycin: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
L-Phenylalanin: zur Synthese	Fluka AG, Buchs SG
L-Arginin: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
4-Aminobuttersäure: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
5-Aminovaleriansäure: zur Synthese	EGA-Chemie, Steinheim/Albuch
6-Aminohexansäure: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
11-Aminoundecansäure: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
Azidoameisensäure-4-methoxybenzylester	EGA-Chemie, Steinheim/Albuch
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Aldrich-Europe, Beerse Belg.
Benzyloxycarbonylchlorid: zur Synthese	Riedel-De Haen, Seelze-Hann.
Chlorameisensäureisobutylester: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
L-[U-^{14}C]Leucin	Amersham Buchler, Braunschw.
[2-^{14}C]Thymidin	Amersham Buchler, Braunschw.
[2-^{14}C]Uridin	Amersham Buchler, Braunschw.
1-^{14}C-Glucose	Amersham Buchler, Braunschw.
[U-^{14}C]Glucose	Amersham Buchler, Braunschw.
POPOP	Serva, Heidelberg
PPO	Merck AG, Darmstadt

3,5-Dimethylpyrazolyl-formaminidiniumnitrat: purum	Fluka AG, Buchs SG
Thionylchlorid	Riedel-De Haen, Seelze-Hann.
2-Chlorethanol: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
Dimethylamin: purum	Fluka AG, Buchs SG
Triethylamin: zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
Trifluoressigsäure: zur Synthese	Riedel-De Haen, Seelze-Hann.
TC 199 Medium	BioMerieux, Nürtingen
Heparin (Liquemin)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
HEPES	Fluka AG, Buchs SG
Nitrocellulose-Filter SM 113	Sartorius, Göttingen
Dünnschichtkarten SI F, Kieselgel mit Fluoreszenz-indikator	Riedel-De Haen, Seelze-Hann.
Dünnschichtkarten CE F, Cellulose mit Fluoreszenz-indikator	Riedel-De Haen, Seelze-Hann.

Alle hier nicht einzeln aufgeführten Reagenzien waren von der Firma Merck AG, Darmstadt.

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert oder nach den üblichen Methoden absolutiert.

2.2. Geräte

Schmelzpunkte: Apparat nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi, Flavil/Schweiz
Alle Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte sind nicht korrigiert.

Elementaranalyse: Elemental Analyzer, Perkin Elmer, Modell 240

Katalytische Hydrierungen: Apparatur nach Parr, Fa. Gerhardt

Isotopenmeßplatz: Tri-Carb-Szintillation-Counter, Fa. Packard, Modell 3003

UV-Lampe: Fluo-Test, Quarzlampengesellschaft mbH, Hanau

2.3. Analysenmethoden

Laufmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie:

a) Für Aminosäuren und freie Amine (40):

System 1 : ButOH/HOAc/H_2O 40 : 10 : 6

System 2 : ButOH/Pyridin/HOAc/H_2O 30 : 20 : 6 : 24

b) Zur Trennung freier Amino- von den entsprechenden Guanidino-Verbindungen (41):

System 3 : EtOH/Propanol-(2)/H_2O/NH_3 5 : 3 : 2 : 1

c) Zur Trennung hydroxyethylierter von den entsprechenden chlorethylierten Verbindungen:

System 4 : Dioxan/EE/MeOH/NH_3/H_2O 5 : 2 : 10 : 2 : 5

Sprühreagenzien für die Dünnschichtchromatographie:

I. Ninhydrin-Reagenz: Für Aminosäuren und Amine (42).
0,3 g Ninhydrin in 100 ml ButOH und 3 ml HOAc.
Entwicklung durch Erhitzen auf 110° C.

II. SAKAGUCHI-Reagenz: Für Arg und andere Guanidino-Derivate.
Lösung A: 30 mg α-Naphthol, 5 g Harnstoff und 5 g NaOH in 100 ml 95% EtOH.
Lösung B: 2 g Brom in 100 ml 5% NaOH.
Mit Lösung A wird vorgesprüht, trocknen lassen und mit Lösung B nachgesprüht.

III. NBP-Reagenz: Für alkylierende Verbindungen (43).
Lösung A: 2% NBP-Lösung in Aceton.
Lösung B: 1 N NaOH
Zunächst wird die trockene DC-Platte mit Lösung A besprüht, sodann 15 min. bei 130° C im Trockenschrank entwickelt und schließlich mit Lösung B nachgesprüht. Bei positiver Reaktion: Intensive Blau-Färbung.

2.4. Darstellung der Verbindungen

2.4.1. ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen und Analoga

Hierbei handelt es sich um drei Typen von Verbindungen:

1. ω-Guanidinocarbonsäuren, die mit ihrer Carboxylgruppe über eine Peptidbindung an die freie Aminogruppe von Phenylalanindimethylamid gekoppelt sind.
2. Monoguanidino-Verbindungen mit drei- und viergliedriger C-Kette und einer Phenylgruppe am entgegengesetzten Ende zur Guanidinogruppe.
3. Ein Tetrapeptid der Sequenz Arg-Gly-Phe-Phe-$N(CH_3)_2$

Die Verbindungen des ersten Typs können, ausgehend von den entsprechenden ω-Aminocarbonsäuren und Phe prinzipiell nach verschiedenen Verfahren synthetisiert werden:

A) Überführung von Phe in Phenylalanindimethylamid:

In 2 Reaktionsschritten: Veresterung von Phe mit MeOH (44) und anschließende Ammonolyse des Phe-OMe mit DMA (45). Die Ammonolyse kann auch nach Kopplung von Phe-OMe an die entsprechende ω-Guanidinocarbonsäure bzw. aminogeschützte ω-Aminosäure erfolgen.

In 3 Reaktionsschritten: Direkte Kopplung von DMA an die freie Carboxylgruppe von aminogeschütztem Phe mit der "Gemischten-Anhydrid-Methode" und anschließender Abspaltung der Amino-Schutzgruppe (46-50).

B) Überführung der ω-Aminocarbonsäuren in die ω-Guanidino carbonsäuren:

Für die Amidinierung der freien ω-Aminogruppe stehen verschie-

dene Methoden zur Verfügung. Die gebräuchlichsten Amidinierungsreagenzien sind S-Methyl-isothioharnstoff (51), O-Methyl-isoharnstoff (52) und das von HABEEB (53) eingeführte 3,5-Dimethylpyrazolyl-formaminidiniumnitrat (DPF). Der Aufbau der Guanidinogruppe kann dabei schon vor der Kopplung an Phenylalanin-dimethylamid erfolgen, wobei die resultierende ω-Guanidinocarbonsäure direkt (ungeschützt) in die Kopplungsreaktin (41) eingesetzt werden kann (2 Reaktionsschritte) oder erst nach erfolgter Bindung der aminogeschützten ω-Aminocarbonsäure nach Abspaltung der Schutzgruppe (4 Reaktionsschritte).

C) Kupplungsmethoden:

Bei der Knüpfung einer Peptidbindung handelt es sich um einen nucleophilen Angriff der Aminokomponente einer carboxygeschützten Aminosäure auf das Carboxy-C-Atom einer N-geschützten Aminosäure. Eine solche Reaktion verläuft umso besser, je positiver dieses C-Atom durch Einführung eines Restes mit elektronenziehenden Eigenschaften gemacht wird. Für eine derartige Carboxyaktivierung wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden entwickelt. Bevorzugt haben sich dabei die Azid-Methode (54), die Carbodiimid-Methode (55-61), die Methode der aktivierten Ester (62) und die gemischte-Anhydrid-Methode (48) bewährt.

Die Verbindungen des Typs 2 können unmittelbar durch Amidinierung der entsprechenden 1-Amino-ω-phenyl-alkane gewonnen werden.

Die Synthese des Tetrapeptids kann prinzipiell nach einer Vielzahl von Methoden erfolgen. Diese ergeben sich zum einen aus Art und Reihenfolge, in der die Peptidbindungen geknüpft werden, zum andern aus den verschiedenen Möglichkeiten zum Schutz

der Amino-, Guanidino- und Carboxyl-Gruppen. Hierbei konnte auf bewährte Vorschriften zurückgegriffen werden (10), wobei die Synthese sukzessive vom Carboxylende her erfolgte.

2.4.2. Chlorethylierte Verbindungen

Bei dieser Verbindungsklasse sind formal je zwei Chlorethylgruppen an die freien Aminogruppen von Aminosäuren oder Dipeptiden gebunden.

Für die Synthese von N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Aminosäuren werden in der Literatur im wesentlichen drei Verfahren beschrieben (37):

1) Ein der Aminosäure entsprechender Aldehyd wird in Gegenwart von $NaHSO_3$ und NaCN analog der Aminosäuresynthese nach STRECKER (64) mit Bis-(2-chlorethyl-)amin (Nor-N-Lost) reagieren lassen (65). Als Zwischenprodukte entstehen dabei N,N-Bis-(2-chlorethyl)-aminonitrile, die anschließend mit conc. HCl in N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Aminosäuren überführt werden.

2) Die entsprechende α-Halogencarbonsäure wird mit Diethanolamin zur N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-Aminosäure umgesetzt, welche mittels Substitution der Hydroxyl-Gruppe durch Cl in die N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Aminosäure überführt werden kann. Für den Austausch der Hydroxyl-Gruppen gegen Cl kommen generell zwei Methoden in Frage: Umsetzung mit Phosphorhalogeniden (PCl_3, PCl_5) oder mit Thionylchlorid (66).

3) Ausgehend von den freien Aminosäuren werden diese direkt mit Ethylenoxid in die N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-Aminosäuren überführt und anschließend chloriert.(37).

Die Synthese der beiden chlorethylierten Dipeptide N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly-Arg bzw. -Phe-Arg könnte prinzipiell auf

zwei verschiedenen Wegen erfolgen:

1) Direkte Kopplung der chlorethylierten Aminosäuren an Arg.

2) Einführung der beiden Chlorethylgruppen erst auf der Stufe der Dipeptide.

Um chlorethylierte bzw. aminogeschützte Aminosäuren an die Aminogruppe des Arg koppeln zu können, muß dieses an der Guanidino- und Carboxylgruppe geschützt sein. Carboxy-Schutz wird durch Amid- oder Esterbildung erreicht. Zum selektiven Schutz der Guanidino-Funktion bieten sich zwei Verfahren an. Der am längsten bekannte und heute noch wichtigste Guanidino-Schutz wird mit der Nitro-Gruppe erreicht (67). Diese kann direkt an die Guanidino-Gruppe angeheftet werden, ohne daß vorher die α-Amino-Funktion geschützt zu sein braucht. In einem anderen Verfahren wird der Guanidino-Schutz mit zwei Z-Resten bewerkstelligt. Hierbei wird aber unter so extrem basischen Bedingungen gearbeitet, daß gleichzeitig die α-Aminogruppe Z-geschützt wird. Aus den von ZERVAS und Mitarbeitern in die Peptidchemie eingeführten N^{α}-Z-N^{δ},N^{ω}-bis-Z-Arginin ist eine selektive Abspaltung des N^{α}-ständigen Z-Rests nur schwer zu erreichen (68). Nach WEYGAND und NINTZ ist dies aber leicht möglich, wenn zuerst die α-Aminogruppe mit dem Z(OMe)-Rest geschützt wird (69,70). Dieser ist schon bei 0° C mit wasserfreier TFA entfernbar, ohne daß dabei Z-Reste angegriffen werden, zu deren Entfernung mit TFA über 75° C erhitzt werden müßte.

2.5. Biologische Meßmethoden

2.5.1. Tests für ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen

Zur Prüfung der synthetisierten -Guanidinoverbindungen auf insulinähnliche biologische Aktivitäten wurde unter den verschiedenen Insulinwirkungen der Einfluß auf Zellpermeabilität und Kohlenhydratstoffwechsel ausgewählt. Als insulinabhängige Organe wurden Muskel, Fettgewebe und Blut verwendet. Hierbei kamen sowohl ein in-vitro-Test als auch ein in-vivo-Test zur Anwendung.

Als in-vitro-Test diente die ^{14}C-Glucoseoxidation in isolierten Fettzellen des epididymalen Gewebes der Ratte, als in-vivo-Test die ^{14}C-Glucoseaufnahme in Muskel, Fettgewebe und Blut der Maus.

2.5.1.1. 1-^{14}C-Glucoseoxidation an isolierten Fettzellen des epididymalen Fettgewebes der Ratte (12,71)

Das epididymale Fettgewebe der Ratte zeigt einen besonders hohen Stoffwechsel. Für die Wege der Glucose im Metabolismus des Fettgewebes ergeben sich mehrere Möglichkeiten: sie kann zu CO_2 oxidiert, in Glycerin überführt, in langkettige Fettsäuren eingebaut oder zu Glykogen polymerisiert werden. Der Abbau der Glucose kann, ausgehend von Glucose-6-Phosphat über zwei verschiedene Wege erfolgen:

1. Über die Glykolyse (EMDEN-MEYERHOF-Weg)
2. Über den Pentosephosphat-Zyklus (WARBURG-DICKENS-HORECKER-Zyklus)

Im allgemeinen verläuft die Glucose-Verwertung im Fettgewebe zu einem bedeutenden Anteil über den Pentosephosphat-Zyklus.

Dieser läßt sich durch Insulin stimulieren (72,73). Für den Kurzzeiteffekt ist dabei vor allem die Aktivierung der Schlüsselenzyme verantwortlich, für den Langzeiteffekt eine Beschleunigung der Transkription und/oder Translation der Enzym-mRNA's, was sich dann in einer Erhöhung der de-novo-Syntheserate dieser Enzyme ausdrückt.

Im Pentosephosphat-Zyklus wird Pentose-6-Phosphat über einen Dehydrogenierungsschritt in 6-Phosphogluconolacton und weiter in Gluconsäure-6-Phosphat überführt. Dieses wird in einem weiteren Dehydrogenierungsschritt in 3-Ketogluconsäure-6-Phosphat umgewandelt, welches spontan unter Abgabe von CO_2 in Ribulose-5-Phosphat zerfällt. Der bei den Dehydrogenierungsschritten freiwerdende Wasserstoff wird als $NADPH_2$ gebunden, welches als Reduktionsäquivalent für reduktiv verlaufende Stoffwechselprozesse, z.B. die Fettsäuresynthese, dienen kann. Hieraus erklärt sich der hohe Anteil des Pentosephosphat-Zyklus beim Glucoseabbau im Fettgewebe.

Da Insulin in Fettzellen die Glucoseaufnahme, den Pentosephosphat-Zyklus und die Fettsäuresynthese stimuliert, kann die Menge des im Pentosephosphat-Zyklus gebildeten CO_2 als Maß für die Stimulierung durch Insulin oder insulinähnlich wirkende Substanzen dienen. Der Kohlenstoff des abgespaltenen CO_2 stammt dabei vom C-1 des Glucosemoleküls. Werden nun die aus dem epididymalen Fettgewebe der Ratten gewonnenen Zellen mit 1-^{14}C-Glucose und Insulin, bzw. der zu untersuchenden Substanz inkubiert, so wird über den Pentosephosphat-Zyklus $^{14}CO_2$ gebildet. Die Menge des anfallenden radioaktiven CO_2 dient nun an eine Base, in diesem Fall Hyamin, gebunden direkt als Meßgröße für den Test. Die Bestimmung erfolgt im Liquid-Scintillation-Counter.

2.5.1.2. In-vivo-Messungen der U-^{14}C-Glucose-Aufnahme in Muskel und Fettgewebe der Maus

Nach intraperitonealer, gleichzeitiger Injektion von Insulin und markierter Glucose in lebende Tiere wird nach RAFAELSEN (74) der ^{14}C-Einbau in das Glykogen von Muskel und Fettgewebe gesteigert. Auf diese und andere Arbeiten aufbauend (75-77) wurde ein modifizierter in-vivo-Test entwickelt. Dabei werden anstelle des Insulins die Testsubstanzen injiziert. Nach einer bestimmten Zeit werden die Tiere getötet, Zwerchfell und Epididymis entnommen und jeweils die aufgenommene Radioaktivität (in cpm/g) bestimmt. Als Leerwert wird bei sonst gleichbehandelten Tieren nur die entsprechende Menge ^{14}C-Glucose ohne Insulin oder Testsubstanz injiziert. In der Weise kann die Menge an Radioaktivität ermittelt werden, die nur auf Grund von Diffusion und normaler Verstoffwechselung in die entsprechenden Organe gelangt ist. Dabei wird keine Unterscheidung zwischen Glucose-Aufnahme, Glykogengehalt und anderen Umwandlungsprodukten getroffen.

2.5.1.3. In-vivo-Bestimmung des Blutzuckergehalts der Maus

Zum Nachweis der hypoglykämischen Aktivitäten von Insulin und insulinähnlichen Stoffen wird der Glucosegehalt des Blutes vor und nach intraperitonealer Injektion von Insulin bzw. Testsubstanz mittels Enzymtest bestimmt (GOD-Perid, Boehringer, Mannheim).

Prinzip: Die Blutglucose wird durch GOD zu Gluconolacton oxydiert, das in wässriger Lösung in Gluconsäure übergeht. Das dabei gebildete Wasserstoffperoxid kann in Gegenwart von

POD das farblose Chromogen o-Dianisidin unter Bildung eines roten Azofarbstoffs dehydrieren. Dessen Intensität ist der Glucose-Konzentration proportional und wird bei Wellenlängen zwischen 430 - 480 nm photometrisch bestimmt (78,79).

2.5.2. In-vitro-Test für chlorethylierte Verbindungen

Bei den bischlorethylierten Verbindungen handelt es sich um Substanzen, die zwei alkylierende Gruppen pro Molekül enthalten. Solche Stoffe sollten in der Lage sein, sich an Biopolymere wie DNA, RNA, Proteine und Phospholipide zu binden und dadurch massiv in die Stoffwechselabläufe der Zellen einzugreifen. Unter der Vielzahl der möglichen cytostatischen Effekte werden im vorliegenden Test die Einflüsse auf die DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese anhand der in-vitro-Einbauraten von ^{14}C-Thymidin, -Uridin und -Leucin ausgewählt.
Die Versuche wurden auf der Grundlage der von WEITZEL und Mitarbeitern entwickelten Methode (80) in Asciteszellen des EHRLICH-Ascitescarcinoms (flüssig) durchgeführt.
Einer Zellsuspension werden jeweils ^{14}C-Thymidin, -Uridin und -Leucin in Gegenwart der zu testenden Verbindungen angeboten. Über einen Zeitraum von zwei Stunden werden zu 4 verschiedenen Zeitpunkten jeweils Proben entnommen und die inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Die cytostatischen Effekte der eingesetzten Substanzen zeigen sich dabei anhand der Abnahme der Zählausbeute im Vergleich mit einer Kontrollgruppe ohne Zusatz chlorethylierter Verbindungen.

3. BESCHREIBUNG DER SYNTHESEN

3.1. ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen und Analoga

Phenylalaninmethylester (44): 750 ml abs. MeOH werden in einer Eis/Kochsalzmischung auf -10° C abgekühlt. Unter Rühren werden 120 ml Thionylchlorid so zugetropft, daß die Reaktionstemperatur -5° C nicht übersteigt. Nach beendeter Zugabe wird noch 30 min. bei dieser Temperatur gerührt. Danach werden 247,5 g Phe (1,5 Mol) in kleinen Portionen eingetragen und die entstandene Suspension auf 40° C gebracht. Nach Rühren über Nacht wird die jetzt klare Lösung im Vakuum zur Trockne einrotiert und noch zweimal mit abs. MeOH abrotiert. Dann wird aus EE unter Zusatz von MeOH umkristallisiert.

Ausbeute 297,6 g (92% der Theorie)
Rf = 0,41 auf CE-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 154 - 156° C (Lit.: 156° C)
$C_{10}H_{14}NO_2Cl$ (215,68)

Ber.:	C 55,65	H 6,54	N 6,50	Cl 16,44
Gef.:	C 55,57	H 6,54	N 6,38	Cl 16,17

1-Hydroxy-benzotriazol (81): 316 g 2-Chlornitrobenzol (2 Mol) werden in 1 l EtOH und 300 g 100% Hydrazinhydrat (292 ml, 6 Mol) während 5 Stunden unter Rühren am Rückflußkühler gekocht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und die zurückbleibende ölige Masse in Wasser aufgenommen, von unlöslichem Material abgetrennt und mit Ether extrahiert. Die wässrige Phase wird im Eisbad mit HCl conc. angesäuert und der Niederschlag abgesaugt. Aus siedendem Wasser wird unter Verwendung von Aktivkohle umkristallisiert. Die Um-

kristallisation wird noch zweimal wiederholt.

Ausbeute: 173,4 g (64% der Theorie)

Fp.: 154 - 156° C (Lit.: 157° C)

$C_6H_5N_3O$ (135,13)

Ber.: C 53,33 H 3,73 H 31,10

Gef.: C 52,98 H 3,61 H 30,98

3.1.1. 4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid

Z-4-Aminobuttersäure: 20,6 g 4-Aminobuttersäure (200 mMol) werden in 80 ml 10% NaOH gelöst und im Eisbad auf ca. 1° C abgekühlt. Unter starkem Rühren werden 32 ml CboCl (200 mMol) innerhalb einer Stunde tropfenweise zugegeben. Gleichzeitig werden, um das pH auf 10 - 12 zu halten, portionsweise 80 ml 10% NaOH zugesetzt. Über Nacht wird gerührt.
Die trübe Lösung wird dann dreimal mit Ether ausgeschüttelt, um nichtumgesetztes CboCl zu entfernen. Die wässrige Phase wird unter Rühren mit conc. HCl auf pH 2 - 3 gebracht, das ausgefallene Produkt abgesaugt und zweimal mit H_2O gewaschen.
Aus EE/PE wird umkristallisiert.

Ausbeute: 39,4 g (83% der Theorie)

Rf = 0,48 auf SI-Platten in Laufmittel 3

Fp.: 66 - 67° C

$C_{12}H_{15}NO_4$ (237,12)

Ber.: C 60,73 H 6,38 N 5,91

Gef.: C 60,59 H 6,28 N 5,77

Z-4-Aminobutyryl-phenylalaninmethylester: 21,6 g Phe-OMe x HCl (100 mMol) werden in 700 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 14 ml TÄA (100 mMol) wird noch 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Absaugen des ausgefallenen Triethylammoniumchlorids werden 23,7 g Z-Aminobuttersäure (100 mMol) zusammen mit 21,6 g HOBt (160 mMol) zugegeben und unter Rühren in Lösung gebracht. Zu der auf 0° C abgekühlten Lösung werden 22,7 g DCCI (110 mMol), gelöst in 100 ml Methylenchlorid, langsam zutropfen lassen. Es wird noch 4 Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anderntags wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und der Niederschlag mit etwas DMF nachgewaschen. Aus dem Filtrat wird das Methylenchlorid abrotiert und die verbleibende Lösung in 1200 ml Eiswasser eingerührt. Die entstehende Emulsion wird mit NaCl gesättigt und das sich abscheidende Öl im Scheidetrichter abgetrennt. Der wäßrige Überstand wird dreimal mit Chloroform extrahiert und das Öl in 500 ml Chloroform aufgenommen. Die Chloroformphasen werden vereinigt und nacheinander je dreimal mit 5% $NaHSO_4$-Lösung, 5% $NaHCO_3$-Lösung und H_2O gewaschen und zuletzt über $MgSO_4$ getrocknet. Die Lösung wird nun zur Trockne einrotiert, der Rückstand in EE aufgenommen und das Produkt mit PE ausgefällt.

Ausbeute: 29,9 g (75% der Theorie)

Rf = 0,88 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 87 - 89° C

$C_{22}H_{26}N_2O_5$ (398,43)

Ber.: C 66,32 H 6,58 N 7,03

Gef.: C 66,41 H 6,67 N 6,98

Z-4-Aminobutyryl-phenylalanin: 19,9 g Z-Aminobutyryl-Phe-OMe (50 mMol) werden in einer Mischung von 150 ml Dioxan und 30 ml H_2O gelöst und 5 Tropfen Thymolphthalein-Lösung hinzugefügt. In Portionen zu je 5 ml werden nun insgesamt 50 ml 1 N NaOH bei 20° C zugegeben, wobei der Laugenverbrauch jeweils durch den Wechsel des Farbindikators von blau nach farblos verfolgt wird. Nach erfolgter NaOH-Zugabe wird noch eine Stunde bei 20° C weitergerührt. Danach wird die Lösung mit 50 ml 1 N HCl versetzt und anschließend einrotiert. Der Rückstand wird in 250 ml EE aufgenommen und die organische Phase 5 mal mit je 100 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Die Bicarbonat-Extrakte werden vereinigt, mit 2 N HCl auf pH 3 gebracht und erneut mit 250 ml EE extrahiert. Die EE-Phase wird je zweimal mit 100 ml H_2O und 100 ml gesättigter NaCl-Lösung säurefrei gewaschen und sodann über $MgSO_4$ getrocknet. Der EE wird bis zur Trübung einrotiert und das Produkt mit PE ausgefällt.

Ausbeute: 16,1 g (84% der Theorie)

Rf = 0,79 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 119 - 121° C

$C_{21}H_{24}N_2O_5$ (384,41)

Ber.: C 65,61 H 6,29 N 7,29

Gef.: C 65,45 H 6,31 N 7,13

Z-4-Aminobutyryl-phenylalanindimethylamid: 15,4 g Z-4-Aminobutyryl-phenylalanin (40 mMol) werden in 200 ml Methylenchlorid suspendiert. Nach Abkühlung auf -15° C werden 60 mMol

DMA (12 ml einer 5 M Lösung von DMA in Methylenchlorid) und 11,2 ml TÄA (80 mMol) zugegeben. Zu dieser Mischung tropft man nun langsam 11,4 ml Chlorameisensäureisobutylester (80 mMol) und läßt im Kältebad über Nacht rühren, so daß sich das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anderntags wird einrotiert, der Rückstand in 300 ml EE aufgenommen, die EE-Phase je dreimal mit 2 N Citronensäure und H_2O gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Einrotieren des EE wird in Chloroform aufgenommen und mit PE gefällt.

Ausbeute: 14,32 g (87 % der Theorie)
Rf = 0,70 auf CE-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 164 - 166° C
$C_{23}H_{29}N_3O_4$ (411,48)
Ber.: C 67,13 H 7,10 N 10,21
Gef.: C 67,05 H 7,15 N 10,01

4-Aminobutyryl-phenylalanindimethylamid: 12,3 g Z-4-Aminobutyryl-phenylalanindimethylamid (30 mMol) werden in 100 ml MeOH suspendiert und darauf 5 min. im Vakuum entgast. Dann wird über Nacht in der Hydrierapparatur mit Pd/C als Katalysator bei ca. 3 bar H_2-Druck geschüttelt. Anderntags wird der Katalysator über eine dreifache Lage Faltenfilter abfiltriert und die Lösung einrotiert. Es wird in 50 ml EtOH abs. aufgenommen und unter Zugabe von Diethylether ausgefällt.

Ausbeute: 7,7 g (93 % der Theorie)
Rf = 0,94 auf CE-Platten in Laufmittel 3
Fp.: 170 - 173° C
$C_{15}H_{23}N_3O_2$ (277,35)

Ber.: C 64,95 H 8,36 N 15,15
Gef.: C 64,73 H 8,19 N 15,23

4- Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid: 6,9 g 4-Aminobutyryl-phenylalanindimethylamid (25 mMol) werden in einer Mischung von 60 ml H_2O und 40 ml EtOH gelöst und 10,8 g DPF (53,7 mMol) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 60 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen. Danach wird vom EtOH abrotiert, 50 ml H_2O und 20 ml NH_3 conc. zugesetzt und die Lösung nacheinander je dreimal mit 50 ml Ether und 50 ml EE gewaschen. Die wässrige Phase wird einrotiert, der Rückstand in 100 ml Propanol-(2) aufgenommen und das Produkt unter vorsichtiger Zugabe von Ether gefällt.

Ausbeute: 5,27 g (66 % der Theorie)
Rf = 0,83 auf CE-Platten in Laufmittel 3
Fp.: 166 - 169° C
$C_{16}H_{25}N_5O_2$ (319,39)
Ber.: C 60,16 H 7,89 N 21,93
Gef.: C 59,88 H 7,61 N 22,21

3.1.2. 5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid

Z-5-Aminovaleriansäure: Zu einer Lösung von 23,4 g 5-Aminovaleriansäure (200 mMol) in 80 ml 10 % NaOH werden bei 0° C abwechselnd 32 ml CboCl und 80 ml 10 % NaOH in etwa 10 Portionen zugegeben und über Nacht rühren gelassen. Anderntags wird die Lösung dreimal mit Ether ausgeschüttelt, die wässrige Phase mit conc. HCl auf ph 3 eingestellt und vom Niederschlag abgenutscht. Der Rückstand wird dreimal mit eiskaltem H_2O

gewaschen und aus EE/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 45,7 g (90 % der Theorie)

Rf = 0,46 auf CE-Platten in Laufmittel 1

$C_{13}H_{17}NO_4$ (251,14) Fp.: 69 - 71° C

Ber.: C 62,12 H 6,82 N 5,58

Gef.: C 62,04 H 6,77 N 5,39

Z-5-Aminovaleryl-phenylalaninmethylester: In 700 ml DMF werden 21,6 g Phe-OMe x HCl (100 mMol) gelöst und nach Zugabe von 14 ml TÄA (100 mMol) noch eine halbe Stunde weitergerührt. Das Triethylammoniumchlorid wird abgesaugt und zum Filtrat 25,1 g Z-5-Aminovaleriansäure (100 mMol) und 23 g HOBt (170 mMol) gegeben. Die Lösung wird auf 0° C abgekühlt und langsam 22,7 g DCCI (110 mMol), in 100 ml Methylenchlorid gelöst, zugetropft. Beim Rühren über Nacht läßt man das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmen. Dann wird vom Niederschlag abgenutscht, aus dem Filtrat das Methylenchlorid abrotiert und die verbleibende Lösung in 1200 ml Eiswasser gegossen. Nach Sättigung der entstandenen Emulsion mit NaCl wird das sich ausscheidende Öl abgetrennt, in 500 ml Chloroform aufgenommen und die wässrige Phase mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen werden je dreimal mit 5 % $NaHSO_4$-Lösung, 5 % $NaHCO_3$-Lösung und H_2O gewaschen und danach über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Abrotieren des Chloroforms wird in EE aufgenommen und das Produkt mit PE gefällt.

Ausbeute: 31,8 g (77 % der Theorie)

Rf = 0,82 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 67 - 68° C

$C_{23}H_{28}N_2O_5$ (412,51)

Ber.: C 66,96 H 6,84 N 6,79

Gef.: C 66,84 H 6,79 N 6,58

Z-5-Aminovaleryl-phenylalanin: In einer Mischung von 150 ml Dioxan und 30 ml H_2O werden 20,6 g Z-5-Aminovaleryl-Phe-OMe (50 mMol) gelöst. Dann werden bei 20° C 50 ml 1 N NaOH portionsweise zugegeben. Der Laugenverbrauch wird wieder mit Thymolphthalein-Indikatorlösung verfolgt. Es wird noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und danach mit 50 ml 1 N HCl versetzt. Nach Einrotieren des Reaktionsgemischs wird der Rückstand in 250 ml EE aufgenommen und die EE-Phase erschöpfend mit insgesamt 500 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Die Bicarbonat-Lösung wird mit verd. HCl auf pH 3 gebracht und dreimal mit EE extrahiert. Die EE-Phase wird mit H_2O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, etwas einrotiert und mit PE gefällt.

Ausbeute: 17,3 g (87 % der Theorie)

Rf = 0,72 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 103 - 105° C

$C_{22}H_{26}N_2O_5$ (398,49)

Ber.: C 66,31 H 6,58 N 7,03

Gef.: C 66,48 H 6,58 N 6,92

Z-5-Aminovaleryl-phenylalanindimethylamid: 15,9 g Z-5-Aminovaleryl-Phe (40 mMol) werden in 200 ml Methylenchlorid suspendiert, auf -15° C abgekühlt und mit 60 mMol DMA und 11,2

ml TÄA (80 mMol) versetzt. Nach Zugabe von 11,4 ml Chlorameisensäureisobutylester (80 mMol) wird noch 10 Stunden gerührt, dann einrotiert und der Rückstand mit 300 ml EE aufgenommen. Die EE-Phase wird nach Waschen mit 2 N Citronensäure und H_2O über $MgSO_4$ getrocknet, einrotiert, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und das Produkt mit PE ausgefällt.

Ausbeute: 14,1 g (83% der Theorie)
Rf = 0,75 auf CE-Platten in Laufmittel 1
$C_{24}H_{31}N_3O_4$ (425,50) Fp.: 176 - 178° C
Ber.: C 67,74 H 7,34 N 9,88
Gef.: C 67,81 H 7,39 N 10,01

5-Aminovaleryl-phenylalanindimethylamid: 12,8 g Z-5-Aminovaleryl-phenylalanindimethylamid (30 mMol) in 100 ml MeOH suspendiert werden über Nacht bei 4 bar Druck mit Pd/C hydriert. Vom MeOH wird einrotiert und aus EtOH mit Ether gefällt.

Ausbeute: 8,7 g (91% der Theorie)
Rf = 0,96 auf CE-Platten in Laufmittel 1
$C_{16}H_{25}N_3O_2$ (291,38) Fp.: 167 - 168° C
Ber.: C 65,95 H 8,65 N 14,42
Gef.: C 66,15 H 8,57 N 14,34

5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid: In einer Mischung aus 50 ml H_2O und 50 ml EtOH werden 7,3 g 5-Aminovaleryl-phenylalanindimethylamid (25 mMol) gelöst. Nach Zugabe von 10,8 g DPF (53,7 mMol) läßt man das Reaktionsgemisch unter Rühren 60 Stunden reagieren. Das EtOH wird nun abrotiert, eine Mischung von 50 ml H_2O und 20 ml NH_3 zugegeben

und die Lösung je dreimal mit 50 ml Ether und 50 ml EE gewaschen. Nach Einrotieren der wässrigen Phase wird der Rückstand in 100 ml Propanol-(2) gelöst und das Produkt mit Ether gefällt.

Ausbeute: 5,8 g (69 % der Theorie)
Rf = 0,86 auf CE-Platten in Laufmittel 3
$C_{17}H_{27}N_5O_2$ (333,42) Fp.: 187 - 189° C
Ber.: C 61,24 H 8,16 N 21,00
Gef.: C 61,03 H 8,27 N 21,29

3.1.3. 6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid

Z-6-Aminohexansäure: In 120 ml 10 % NaOH werden 39,4 g 6-Aminohexansäure (300 mMol) gelöst und auf 0 - 3° C abgekühlt. Portionsweise werden dann abwechselnd 48 ml CboCl (300 mMol) und 120 ml 10 % NaOH zugegeben und weitere 24 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird sodann dreimal mit Ether extrahiert und die wässrige Phase mit conc. HCl auf pH 2,5 gebracht. Der audfallende Niederschlag wird abgesaugt, mehrmals mit eiskaltem H_2O gewaschen und aus EE/PE umkristallisiert.

Ausbeute 70,3 g (88 % der Theorie)
Rf = 0,63 auf SI-Platten in Laufmittel 2
$C_{14}H_{19}NO_4$ (265,30) Fp.: 52 - 53° C
Ber.: C 63,38 H 7,22 N 5,28
Gef.: C 63,36 H 7,10 N 5,17

Z-6-Aminohexanoyl-phenylalaninmethylester: 17,3 g Phenylalaninmethylester-hydrochlorid (80 mMol) werden zusammen mit 11,2 ml TÄA (80 mMol) in 750 ml DMF gelöst und nach

einer halben Stunde Rühren wird vom gebildeten Triethylammoniumchlorid abgenutscht. Zum Filtrat werden nun 21,2 g Z-6-Aminohexansäure (80 mMol) und 20,3 g HOBt (150 mMol) gegeben und nach Abkühlen auf 0° C läßt man langsam 18,2 g DCCI (88 mMol), in 80 ml Methylenchlorid gelöst, zutropfen. Nach erfolgter Zugabe läßt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren und saugt dann vom gebildeten Niederschlag ab. Aus dem Filtrat wird das Methylenchlorid im Vakuum abgezogen und die verbleibende Lösung in 1000 ml Eiswasser gegossen. Das dabei ausfallende Produkt wird abgesaugt, mit H_2O DMF-frei gewaschen und in 500 ml EE aufgenommen. Die EE-Phase wird nacheinander dreimal mit 5% $NaHSO_4$-Lösung und 5% $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, mit H_2O Bicarbonat-frei gewaschen und über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Der EE wird etwas eingeengt und das Produkt durch Zugabe von PE gefällt.

Ausbeute: 28,3 g (83% der Theorie)
Rf = 0,76 auf CE-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 79 - 83° C
$C_{24}H_{30}N_2O_5$ (426,49)
Ber.: C 67,58 H 7,09 N 6,57
Gef.: C 67,63 H 7,14 N 6,35

Z-6-Aminohexanoyl-phenylalanin: 17 g Z-Aminohexanoyl-phenylalaninmethylester (40 mMol) werden in 150 ml Dioxan und 30 ml H_2O suspendiert. Unter Verwendung von Thymolphthalein-Indikatorlösung werden nun 40 ml 1 N NaOH in Portionen zugegeben und noch eine Stunde gerührt. Nach Versetzen mit 40 ml 1 N HCl wird das Reaktionsgemisch einrotiert, in 250 ml EE aufgenommen und die EE-Phase mit 500 ml gesättigter

$NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Die wäßrige Bicarbonat-Phase wird nun mit 2 N HCl auf pH 3 eingestellt und mehrmals mit EE ausgezogen. Die vereinigten EE-Phasen werden mit H_2O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und durch Zugabe von PE ausgefällt.

Ausbeute: 14,7 g (89 % der Theorie)
Rf = 0,67 auf CE-Platten in Laufmittel 1
$C_{23}H_{28}N_2O_5$ (412,47) Fp.: 115 - 117° C
Ber.: C 66,97 H 6,84 N 6,79
Gef.: C 67,12 H 6,96 N 6,93

Z-6-Aminohexanoyl-phenylalanindimethylamid: 12,4 g Z-6-Aminohexanoyl-Phe (30 mMol), suspendiert in 200 ml Methylenchlorid, werden bei -15° C mit 9 ml DMA (45 mMol) und 8,4 ml TÄA (60 mMol) versetzt. Sodann werden langsam 8,6 ml Chlorameisensäureisobutylester (60 mMol) zutropfen lassen. Über Nacht wird gerührt, dann einrotiert, der Rückstand mit 300 ml EE aufgenommen und die EE-Phase mit 2N Citronensäure und H_2O gewaschen. Über $MgSO_4$ wird getrocknet, der EE einrotiert, in 100 ml Chloroform aufgenommen und durch Zugabe von PE ausgefällt.

Ausbeute: 11,5 g (87 % der Theorie)
Rf = 0,76 auf SI-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 195 - 197° C
$C_{25}H_{33}N_3O_4$ (439,53)
Ber.: C 68,31 H 7,57 N 9,56
Gef.: C 68,40 H 7,67 N 9,29

6-Aminohexanoyl-phenylalanindimethylamid: In der Hydrierapparatur werden 11 g Z-6-Aminohexanoyl-Phe-dimethylamid (25 mMol), in 50 ml MeOH und 50 ml HOAc gelöst, bei einem Druck von 3 bar während 10 Stunden hydriert. Anschließend wird im Vakuum vom Lösungsmittel abgezogen und unter Zugabe von EtOH mehrmals einrotiert bis keine HOAc mehr im Kolben ist. Dann wird in EtOH aufgenommen und mit Ether gefällt.

Ausbeute: 7,2 g (94 % der Theorie)
Rf = 0,97 auf CE-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 178 - 179° C
$C_{17}H_{27}N_3O_2$ (305,40)
Ber.: C 66,85 H 8,91 N 13,76
Gef.: C 66,67 H 8,88 N 13,66

6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid: 6,1 g 6-Aminohexanoyl-Phe-dimethylamid (20 mMol) werden in 50 ml H_2O und 50 ml EtOH gelöst und unter Rühren 8,6 g DPF (42,7 mMol) zugesetzt. Man läßt nun 3 Tage bei Raumtemperatur rühren, zieht dann das EtOH ab und gibt zu der wäßrigen Suspension 50 ml NH_3. Die wäßrige Phase wird je dreimal mit 50 ml Ether und 50 ml EE gewaschen, einrotiert und der Rückstand in 100 ml Propanol-(2) aufgenommen. Unter Zugabe von Ether wird das Produkt gefällt.

Ausbeute: 4,9 g (70 % der Theorie)
Rf = 0,88 auf CE-Platten in Laufmittel 3
Fp.: 219 - 225° C (zers.)
$C_{18}H_{29}N_5O_2$ (347,44)
Ber.: C 62,22 H 8,41 N 20,16
Gef.: C 62,36 H 8,55 N 20,32

3.1.4. 11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid:

Z-11-Aminoundecansäure: 40,3 g 11-Aminoundecansäure (200 mMol) werden in 80 ml 10 % NaOH und 120 ml THF suspendiert und auf 0-3° C abgekühlt. Dazu werden dann portionsweise unter heftigem Rühren 48 ml CboCl (300 mMol) und 120 ml 10 % NaOH gegeben. Nach zweitägigem Rühren wird mehrmals mit Ether ausgezogen, einrotiert und der Rückstand in 200 ml H_2O suspendiert. Sodann wird das pH mit conc. HCl auf 2 eingestellt, vom Ungelösten abgenutscht und der Rückstand mit H_2O gewaschen. In heißem EE wird suspendiert und soviel THF zugesetzt, bis gerade Lösung eingetreten ist. Durch Zugabe von PE wird ausgefällt.

Ausbeute: 64,3 g (96 % der Theorie)
Rf = 0,63 auf SI-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 113 - 115° C
$C_{19}H_{29}NO_4$ (335,43)
Ber.: C 68,03 H 8,71 N 4,18
Gef.: C 67,99 H 8,69 N 4,07

Z-11-Aminoundecanoyl-phenylalaninmethylester: 25,2 g Phe-OMe x HCl (116,4 mMol) werden in 800 ml DMF gelöst und nach Zugabe von 16,3 ml TÄA (116,4 mMol) wird noch 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Vom ausgefallenen Triethylammoniumchlorid wird abgenutscht und zu dem Filtrat unter gelindem Erwärmen 39 g Z-Aminoundecansäure (116,4 mMol) und 30 g HOBt (210 mMol) zugegeben. Die Lösung wird nun im Eisbad auf 0° C abgekühlt und sodann 27 g DCCI (128 mMol), in 150 ml Methylenchlorid gelöst, langsam zutropfen lassen. Es wird noch 24 Stunden bei

Raumtemperatur gerührt und vom gebildeten Niederschlag abgenutscht. Der Niederschlag wird mit warmem DMF gewaschen, vom Filtrat das Methylenchloridim Vakuum abgezogen und die verbleibende Lösung in 1 l Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit H_2O DMF-frei gewaschen und in 1000 ml EE unter Erwärmen gelöst. Die EE-Phase wird nacheinander je dreimal mit 5% $NaHSO_4$-Lösung und 5% $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, mit H_2O Bicarbonat-frei gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Durch Zugabe von PE wird das Produkt in der Kälte gefällt.

Ausbeute: 53,2 g (92% der Theorie)
Rf = 0,73 auf SI-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 127 - 129° C
$C_{29}H_{40}N_2O_5$ (496,62)
Ber.: C 70,13 H 8,12 N 5,64
Gef.: C 70,31 H 7,99 N 5,43

Z-11-Aminoundecanoyl-phenylalanin: In einer Mischung von 200 ml Dioxan und 30 ml H_2O werden 14,9 g Z-11-Aminoundecanoyl-Phe-OMe (30 mMol) suspendiert. Dann werden bei Raumtemperatur 30 ml 1 N NaOH unter heftigem Rühren portionsweise zugegeben, wobei der NaOH-Verbrauch mit Thymolphthalein-Indikatorlösung verfolgt wird. Es wird noch 24 Stunden bei Raumtemperatur intensiv gerührt und sodann mit 30 ml 1 N HCl versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nun einrotiert, in 500 ml EE aufgenommen und von etwas Ungelöstem abfiltriert. Die EE-Phase wird je dreimal mit 5% $NaHCO_3$-Lösung, H_2O, 5% $NaHSO_4$-Lösung und wieder mit H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Produkt mit PE ausgefällt.

Ausbeute: 13,4 g (93% der Theorie)

Rf = 0,88 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 159 - 165° C (zers.)

$C_{28}H_{38}N_2O_5$ (482,59)

Ber.: C 69,68 H 7,94 N 5,80

Gef.: C 69,61 H 7,77 N 5,91

Z-11-Aminoundecanoyl-phenylalanindimethylamid: In 200 ml Methylenchlorid werden 12,1 g Z-11-Aminoundecanoyl-Phe (25 mMol) suspendiert und nach abkühlen auf -15° C mit 37,5 mMol DMA (7,5 ml einer 5M Lösung von DMA in Methylenchlorid) und 7 ml TÄA (50 mMol) versetzt. Nach Zugabe von 7,2 ml Chlorameisensäureisobutylester (50 mMol) wird noch 2 Tage intensiv gerührt, dann einrotiert und der Rückstand in 300 ml EE aufgenommen. Die EE-Phase wird erschöpfend mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, dann je dreimal mit H_2O, 2N Citronensäure und erneut mit H_2O ausgeschüttelt und über $MgSO_4$ getrocknet. Mit PE wird ausgefällt.

Ausbeute: 11,6 g (91% der Theorie)

Rf = 0,85 auf SI-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 181 - 184° C

$C_{30}H_{43}N_3O_4$ (509,66)

Ber.: C 70,69 H 8,50 N 8,24

Gef.: C 70,99 H 8,67 N 8,61

11-Aminoundecanoyl-phenylalanindimethylamid: 10,2 g Z-11-Aminoundecanoyl-Phe-dimethylamid (20 mMol) werden in einer Mischung von 50 ml HOAc und 50 ml MeOH gelöst und über Nacht bei einem Druck von 4 bar hydriert. Anderntags wird einrotiert,

zur Entfernung der HOAc mehrmals mit EtOH eingeengt und zuletzt in heißer ethanolischer HCl gelöst. Mit PE wird das Produkt ausgefällt.

Ausbeute: 7,83 g (95% der Theorie)

Rf = 0,94 auf SI-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 179 - 182° C

$C_{22}H_{37}N_3O_2$ x HCl (412,00)

Ber.: C 64,13 H 9,30 N 10,20 Cl 8,61

Gef.: C 63,98 H 9,23 N 10,37 Cl 8,78

11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid: 6,2 g 11-Aminoundecanoyl-Phe-dimethylamid x HCl (15 mMol) werden zusammen mit 6,4 g DPF (32 mMol) in heißem EtOH gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 2,1 ml TÄA (15 mMol), gelöst in 50 ml EtOH, langsam zutropfen lassen. Man rührt noch 3 Tage bei Raumtemperatur, engt dann bis auf ca. 50 ml ein und gibt unter Erwärmen 50 ml NH_3 conc. zu. Das Reaktionsgemisch wird nun 5 Tage bei Raumtemperatur stehen lassen. Vom ausgefallenen Niederschlag wird sodann abgenutscht, der Niederschlag dreimal mit eiskaltem H_2O, das mit NH_3 auf pH 8 gebracht wurde gewaschen und anschließend getrocknet. Das Produkt wird nun in heißer ethanolischer HCl gelöst und nach Abkühlen mit Ether als Hydrochlorid gefällt.

Ausbeute: 3,5 g (52% der Theorie)

Rf = 0,91 auf CE-Platten in Laufmittel 3

Fp.: 193 - 196° C

$C_{23}H_{39}N_5O_2$ x HCl (454,03)

Ber.: C 60,84 H 8,88 N 15,42 Cl 7,81

Gef.: C57,58 H 8,47 N 14,60 Cl 12,57

3.1.5. 1-Guanidino-3-phenylpropan

6,75 g (7,1 ml) 3-Phenylpropylamin (50 mMol) werden in einer Mischung von 80 ml H_2O und 20 ml EtOH gelöst und 21,6 g DPF (107,5 mMol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch läßt man nun 40 Stunden bei Raumtemperatur und 24 Stunden bei 0° C rühren und saugt dann vom Ungelösten ab. Der Niederschlag wird in 150 ml H_2O, das mit NH_3 auf pH 8 eingestellt wurde, suspendiert, die wässrige Phase dreimal mit Ether extrahiert und einrotiert. Der Rückstand wird in 50 ml heißem Propanol-(2) gelöst und das Produkt nach Abkühlen auf Raumtemperatur durch Zugabe von PE gefällt.

Ausbeute: 4,9 g (55% der Theorie)

Rf = 0,86 auf CE-Platten in Laufmittel 3

Fp.: 121 - 123° C

$C_{10}H_{15}N_3$ (177,24)

Ber.: C 67,76 H 8,53 N 23,71

Gef.: C 67,73 H 8,44 N 23,83

3.1.6. 1-Guanidino-4-phenylbutan

In einer Mischung von 70 ml H_2O und 30 ml EtOH werden 7,5 g 4-Phenylbutylamin (50 mMol) zusammen mit 21,6 g DPF (107,5 mMol) gelöst und 60 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur reagieren lassen. Nach Abkühlung auf 0° C wird etwas NH_3-Gas durch die Suspension geleitet. Anschließend wird das ausgefallene Produkt abgenutscht und der Niederschlag dreimal mit Ether gewaschen. In 50 ml heißem Propanol-(2) wird gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit PE gefällt.

Ausbeute: 6 g (63% der Theorie)

Rf = 0,83 auf CE-Platten in Laufmittel 3

$C_{11}H_{17}N_3$ (191,27) Fp.: 155 - 157° C

Ber.: C 69,07 H 8,96 N 22,00

Gef.: C 69,12 H 8,92 N 21,89

3.1.7. Arginyl-glycyl-phenylalanyl-phenylalanindimethylamid

N-Benzyloxycarbonyl-phenylalanin: 33 g Phe (200 mMol) werden in 100 ml 2 N NaOH gelöst und mit Eis auf ca. 1° C gebracht. Unter starkem Rühren werden 32 ml CboCl (200 mMol) innerhalb einer Stunde langsam zutropfen lassen. Gleichzeitig werden, um das pH auf 10 - 12 zu halten, portionsweise 100 ml 2 N NaOH dazugegeben. Über Nacht wird gerührt. Die trübe Lösung wird dreimal mit Ether ausgeschüttelt und dann die H_2O-Phase mit conc. HCl auf pH 2-3 eingestellt. Das ausfallende Produkt wird abgesaugt, mit H_2O gewaschen, im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet und mit EE/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 47,3 g (79% der Theorie)

Rf = 0,37 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 87 - 88° C (Lit.: 88 - 89° C)

$C_{17}H_{17}NO_4$ (299,31)

Ber.: C 68,21 H 5,73 N 4,68

Gef.: C 68,17 H 5,74 N 4,78

N-Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester: 21,6 g Phe-OMe x HCl (100 mMol) werden in 50 ml DMF gelöst

14 ml TÄA (100 mMol) zugegeben und 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird vom ausgefallenen Triethylammoniumchlorid abgenutscht und der Niederschlag mit etwas DMF nachgewaschen. Zum Filtrat werden nun unter Rühren 29,9 g Z-Phe (100 mMol) gegeben, die Reaktionsmischung auf 0° C abgekühlt und tropfenweise 23 g DCCI (11,5 mMol) binnen 30 min. zugesetzt. Danach wird der Ansatz noch 2 Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach beendeter Reaktion wird noch etwas AcOH hinzugefügt, noch 30 min. rühren lassen und dann vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingeengt, in THF aufgenommen und in das zweifache Volumen Eiswasser gegossen. Der gebildete Niederschlag wird abgenutscht, in Chloroform aufgenommen und je dreimal mit 1 N $NaHCO_3$-Lösung, H_2O, 2 N Citronensäure und wieder mit H_2O gewaschen. Die Chloroform-Phase wird über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet, einrotiert, der Rückstand in EE aufgenommen und das Produkt unter Zugabe von PE ausgefällt. Aus EE/PE wird umkristallisiert und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 29,9 g (65% der Theorie)

Rf = 0,93 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 152 - 153° C

$C_{27}H_{28}N_2O_5$ (460,51)

Ber.: C 70,42 H 6,13 N 6,08

Gef.: C 70,71 H 6,28 N 6,34

<u>L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester</u>: 25 g Z-Phe-Phe-OMe (54,3 mMol) werden in 75 ml 1 N HCl/AcOH und 100 ml MeOH

gelöst und unter Zugabe von zwei Spatelspitzen Pd/C während 5 Stunden bei einem Druck von 3 - 5 bar hydriert. Danach wird vom Pd/C abfiltriert und das Filtrat unter mehrmaliger Zugabe von EtOH einrotiert. Der Rückstand wird in abs. EtOH aufgenommen und das Produkt unter Zugabe von Ether gefällt. Aus EtOH/Ether wird umgefällt und über KOH im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 18,1 g (92% der Theorie)

Rf = 0,29 auf SI-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 193 - 194° C

$C_{19}H_{22}N_2O_3$ x HCl (362,84)

Ber.: C 62,89 H 6,39 N 7,72

Gef.: C 63,03 H 6,43 N 7,58

N-t-Butyloxycarbonyl-glycin (82 - 84): 37,6 g Gly (500 mMol) werden in 200 ml H_2O und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml 4 N t-Boc-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und mit 4 N NaOH bei pH 10 am Autotitrator titriert. Die Reaktion ist nach ca. 7 Stunden beendet. Das Reaktionsgemisch wird einrotiert. der Rückstand in 750 ml H_2O gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die wäßrige Phase wird dann mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 gebracht und das sich abscheidende Öl mit EE mehrmals extrahiert. Die vereinigten EE-Extrakte werden mit kaltgesättigter NaCl-Lösung säurefrei gewaschen und mit wasserfreiem $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet. Nach dem Abfiltrieren wird die Lösung etwas einrotiert und das Produkt mit PE gefällt. Aus EE/PE wird umgefällt.

Ausbeute: 80,8 g (92,2% der Theorie)

Rf = 0,87 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 93 - 94° C (Lit.: 94° C)

$C_7H_{13}NO_4$ (175,19)

Ber.: C 47,99 H 7,48 N 8,00

Gef.: C 47,91 H 7,63 N 8,15

N-t-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanin-methylester: 15,3 g Boc-Gly (40 mMol) werden zusammen mit 14,5 g Phe-Phe-OMe x HCl (40 mMol) in 160 ml DMF gelöst und unter Rühren 6,5 ml TÄA zugegeben. Es wird noch 30 min. weitergerührt, vom ausgefallenen Triethylammoniumchlorid abfiltriert und zum Filtrat 9,5 g HOBt (70 mMol) gegeben. Nach Abkühlen auf 0° C werden innerhalb einer Stunde 9,1 g DCCI, in 40 ml DMF gelöst zugetropft. Danach wird noch 1 Stunde bei 0° C und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das Filtrat etwas eingeengt und in das 4-fache Volumen Eiswasser gegossen. Der ausgefallene Niederschlag wird abgenutscht, mit etwas Eiswasser nachgewaschen und in EE aufgenommen. Die EE-Phase wird nacheinander je dreimal mit 5% $NaHSO_4$-Lösung und 5% $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, mit H_2O bicarbonatfrei gewaschen und über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Die intensiv gelbe Lösung wird über Aktivkohle gereinigt, nach Filtration etwas einrotiert und unter vorsichtiger Zugabe von PE das Produkt ausgefällt. Aus EE/PE wird mehrmals umgefällt und das ausgefallene Produkt schließlich im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 15,3 g (79% der Theorie)

Rf = 0,93 auf SI-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 153 - 154° C

$C_{26}H_{33}N_3O_6$ (483,55)

Ber.: C 64,58 H 6,88 N 8,69

Gef.: C 64,32 H 6,61 N 8,85

Glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester: 14 g Boc-Gly-Phe-Phe-OMe (29 mMol) werden in 145 ml 1 N HCl/AcOH gelöst und intensiv gerührt. Nach 1 Stunde wird unter mehrmaliger Zugabe von EtOH einrotiert. Der Rückstand wird in abs. EtOH aufgenommen und unter sorgfältiger Zugabe von Ether ausgefällt. Das anfallende Öl wird dreimal mit EE ausgekocht, in möglichst wenig abs. EtOH gelöst und mit Ether gefällt. Aus abs. EtOH/Ether wird mehrmals umgefällt.

Ausbeute: 10,4 g (85% der Theorie)

Rf = 0,66 auf SI-Platten in Laufmittel 2

Fp.: 179 - 182° C

$C_{21}H_{25}N_3O_4$ x HCl (419,89)

Ber.: C 60,07 H 6,24 N 10,01 Cl 8,44

Gef.: C 59,89 H 6,13 N 9,83 Cl 8,19

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-arginin: Zu einer Lösung von 126 g $NaHCO_3$ in 500 ml H_2O werden unter Rühren 75,6 g Arg (400 mMol) gegeben. Nach Abkühlen auf 2 - 5° C werden zu dem Gemisch innerhalb von 30 min. 74,8 g CboCl (420 mMol) langsam gegeben. Nach 1 Stunde Rühren wird das pH mit konz. NH_3 auf 8,5 eingestellt und weitere 6 Stunden bei 2 - 5° C gerührt. Das ausgefallene kristalline Produkt wird abgesaugt, mit Ether CboCl-frei gewaschen und aus siedendem H_2O, dem einige Tropfen NH_3 zugesetzt werden (pH ca. 9), umkristallisiert.

Ausbeute: 112,7 g (91,4% der Theorie)

Rf = 0,77 auf CE-Platten in Laufmittel 2

Fp.: 173 - 174° C (Lit.: 175° C)

$C_{14}H_{20}N_4O_4$ (308,34)

Ber.: C 54,54 H 6,54 N 18,17

Gef.: C 54,53 H 6,38 N 18,28

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-L-arginin:

Zu 108,75 g Z-Arg-OH (353 mMol), in 700 ml 2N NaOH gelöst, werden unter kräftigem Rühren zunächst 250 ml Dioxan und darauf bei 0 - 3° C 245 ml CboCl und 882,5 ml 2N NaOH gegeben. Die Zugabe von Acylchlorid und Lauge erfolgt abwechselnd in ca. 10 Portionen innerhalb einer Stunde. Nach einstündigem Nachrühren bei 0 - 3° C wird das ausgefallene Na-Salz des Produkts abgenutscht und mit 750 ml eiskalter 5% $NaCO_3$-Lösung gewaschen. Das trockengesaugte Na-Salz wird mit Ether verrieben, erneut abgenutscht und nochmals mit Ether gewaschen. Danach wird das trockene Salz in siedendem EtOH aufgenommen, nach zweitägigem Stehen im Kühlschrank das wieder ausgefallene Salz abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Nun wird in 3750 ml EE suspendiert und unter Rühren 875 ml eiskalte 2% H_2SO_4 zugegeben. Sobald Lösung erfolgt ist, wird die EE-Phase abgetrennt, mit 2% H_2SO_4 und H_2O gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird mehrfach mit PE digeriert und anschließend aus EE/PE umgefällt.

Ausbeute: 60,4 g (29,7% der Theorie)

Rf = 0,94 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 136 - 138° C (Lit.: 138° C)

$C_{30}H_{32}N_4O_8$ (576,61)

Ber.: C 62,50 H 5,60 N 9,72

Gef.: C 62,48 H 5,49 N 9,56

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-L-arginin-p-nitrophenylester: 47,8 g Z-Arg(Z)$_2$-OH (83 mMol) werden zusammen mit 13,9 g p-Nitrophenol (100 mMol) in siedendem EE gelöst und dann in einem Eisbad langsam abgekühlt. Bei 0° C werden langsam 17,2 g DCCI (83 mMol), gelöst in 20 ml Methylenchlorid, zugetropft. Darauf läßt man noch 96 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionsmischung wird sodann abgesaugt und der Rückstand solange mit heißem EE extrahiert, bis sein Gewicht der theoretisch zu erwartenden Menge Dicyclohexylharnstoff entspricht. Die vereinigten EE-Phasen werden bis zur Trockne einrotiert, der Rückstand 6mal mit abs. EtOH ausgekocht und jeweils nach Erkalten abgesaugt. Umkristallisiert wird aus heißem EE/PE.

Ausbeute: 46,7 g (81 % der Theorie)

Fp.: 132 - 134° C (Lit.: 134 - 135° C)

$C_{36}H_{35}N_5O_{10}$ (679,71)

Ber.: C 61,97 H 5,06 N 10,04

Gef.: C 62,05 H 5,10 N 9,94

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninmethylester:
7 g Gly-Phe-Phe-OMe (16,7 mMol) werden in 250 ml DMF gelöst und 2,33 ml TÄA zugesetzt. Nach halbstündigem Rühren wird das ausgefallene Triethylammoniumchlorid abgenutscht. Zum

Filtrat werden unter Rühren 11,6 g festes Z-Arg(Z)$_2$-ONp gegeben und 48 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach wird die Reaktionslösung in 1 l Eiswasser gegossen, das ausgefallene Produkt abgesaugt und mit etwas Eiswasser nachgewaschen. Der Niederschlag wird im Exsikkator getrocknet und mit abs. EtOH ausgekocht. Nach Erkalten wird abgesaugt. Dieser Schritt wird solange wiederholt, bis die ethanolische Phase völlig farblos ist. Dann wird der Niederschlag im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 10,7 g (68% der Theorie)

Rf = 0,28 auf CE-Platten in Laufmittel 2

$C_{51}H_{55}N_7O_{11}$ (942,03)

Fp.: 193 - 194° C

Ber.: C 65,02 H 5,89 N 10,41

Gef.: C 64,81 H 5,60 N 10,69

<u>N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanin</u>:

9 g Z-Arg(Z)$_2$-Gly-Phe-Phe-OMe (9,6 mMol) werden in 35 ml Aceton und 15 ml DMF gelöst. Dann werden langsam 5,3 ml 2 N NaOH (10,6 mMol) zutropfen lassen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird mit 10,6 ml 1 N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in EE aufgenommen. Die EE-Phase wird je dreimal mit 1 N Citronensäure und H_2O gewaschen und dann über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Sodann wird etwas eingeengt und das Produkt mit PE gefällt. Umgefällt wird aus EE/PE.

Ausbeute 5,8 g (65% der Theorie)

Rf = 0,84 auf CE-Platten in Laufmittel 2

Fp.: 191 - 193° C

$C_{50}H_{54}N_7O_{11}$ (929,01)

Ber.: C 64,64 H 5,86 N 10,55

Gef.: C 64,89 H 5,60 N 10,22

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanindimethylamid: 4,6 g Z-Arg(Z)$_2$-Gly-Phe-Phe-OH (5 mMol) werden in 100 ml Dichlormethan suspendiert, 1,4 ml TÄA (10 mMol) zugesetzt, auf -15° C abgekühlt und vorsichtig 10 ml einer frisch bereiteten 2 M Lösung von DMA in Dichlormethan (20 mMol) zugegeben. In diese Mischung werden nun langsam 2,8 ml Chlorameisensäureisobutylester (20 mMol) eingebracht. Es wird noch eine Stunde im Kältebad bei -15° C und weiter über Nacht gerührt, wobei man den Reaktionsansatz auf Raumtemperatur erwärmen läßt. Anderntags wird einrotiert, der Rückstand in 100 ml EE aufgenommen, die EE-Phase je dreimal mit 1 N $NaHCO_3$-Lösung, 2 N Citronensäure und H_2O gewaschen und über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Unter Zugabe von PE wird gefällt und aus EE/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 4,6 g (91 % der Theorie)

Rf = 0,76 auf SI-Platten in Laufmittel 2

$C_{52}H_{59}N_8O_{10}$ (956,06)

Fp.: 184 - 186° C

Ber.: C C 65,32 H 6,22 N 11,72

Gef.: C 64,93 H 5,95 N 11,99

L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanindimethylamid:

4,6 g Z-Arg(Z)$_2$-Gly-Phe-Phe-N(CH$_3$)$_2$ (4,8 mMol) werden in 30 ml HOAc und 20 ml MeOH gelöst. Durch die Lösung wird 5 Minuten ein N_2-Strom geleitet. Nach Zugabe von 25 ml 0,1 N HCl werden 2 Spatelspitzen Pd/C hinzugefügt und die Reaktionsmischung an der Hydrierapparatur bei 3 - 5 bar während 10 Stunden hydriert. Nach beendeter Abspaltung der Z-Gruppen wird vom Katalysator abfiltriert, die Lösung unter mehrmaliger Zugabe von EtOH einrotiert, der Rückstand in wenig methanolischer HCl (1 N) aufgenommen und das Produkt durch Zusatz von Ether gefällt. Umgefällt wird aus abs. EtOH/Ether.

Ausbeute: 1,95 g (65% der Theorie)

Rf = 0,35 auf SI-Platten in Laufmittel 2

Fp.: 169-171° C

$C_{28}H_{40}N_8O_4$ x 2 HCl (625,60)

Ber.: C 53,76 H 6,77 N 17,91

Gef.: C 54,08 H 6,93 N 17,51

3.2. Chlorethylierte Verbindungen

3.2.1. Schutzgruppen an Arginin

3.2.1.1. N^{δ},N^{ω}-Bis-benzyloxycarbonyl-L-argininmethylester

N^{α}-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-L-arginin: Zu einer Lösung von 78 g Arg (440 mMol) in 550 ml H_2O werden unter Rühren 140 g $NaHCO_3$ gegeben und bei 0 - 3° C langsam 100 g Z(OMe)-Azid, in 615 ml Dioxan gelöst, zutropfen lassen. Man läßt nun 48 Stunden bei Raumtemperatur weiterrühren. Nach beendeter Reaktion wird vom Ungelösten abfiltriert, das Filtrat zweimal mit Ether extrahiert und dann vorsichtig mit HCl conc. auf pH 3 eingestellt. die saure Lösung wird darauf zweimal mit EE ausgezogen, mit NH_3 conc. auf pH 7 gebracht und zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird in 85° C heißem H_2O, das mit einigen Tropfen NH_3 auf pH 8 eingestellt ist, gelöst. Nach einer Woche stehen bei Raumtemperatur fällt das Produkt aus. Es wird abgenutscht, mit eiskaltem H_2O, EE und Ether gewaschen und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute 102,7 g (96 % der Theorie)
Rf = 0,75 auf CE-Platten in Laufmittel 2
Fp.: 181 - 182° C (Lit.: 181 - 182° C)
$C_{15}H_{22}N_4O_5$ (338,35)
Ber.: C 53,25 H 6,55 N 16,56
Gef.: C 53,14 H 6,68 N 16,39

N^{α}-p-Methoxybenzyloxycarbonyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-L-arginin: Zu 47,7 g Z(OMe)-Arg-OH (141 mMol), gelöst in

280 ml 2 N NaOH und 100 ml Dioxan, werden bei 0 - 3° C unter kräftigem Rühren 96 ml CboCl und 353 ml 2 N NaOH zugetropft. Die Zugabe von Acylchlorid und NaOH erfolgt abwechselnd in etwa 10 Portionen innerhalb einer Stunde. Man läßt noch eine weitere Stunde rühren und Saugt dann das ausgefallene Na-Salz ab. Der Niederschlag wird mit 180 ml eiskalter 5% Na_2CO_3-Lösung gewaschen und darauf in 1000 ml Chloroform unter geringfügigem Erwärmen gelöst. Die Chloroform-Phase wird mit 90 ml eiskalter 5% Na_2CO_3-Lösung gewaschen und dann über $MgSO_4$ getrocknet. Beim Einrotieren verbleibt ein öliger Rückstand, welcher mit 1 l Ether digeriert wird. Über Nacht läßt man das Reaktionsprodukt in einem Trockeneis/EtOH-Bad bei ca. -25° C auskristallisieren. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

Das trockene Na-Salz wird in 500 ml siedendem absoluten EtOH gelöst. Nach zweitägigem Stehen im Kühlschrank scheiden sich schmierige Kristalle ab. Diese werden in 1,4 l EE suspendiert und unter heftigem Rühren werden dann 350 ml 2% kalte H_2SO_4 zugegeben. Sobald Lösung erfolgt ist, wird die EE-Phase abgetrennt, mit 350 ml 2% kalter H_2SO_4 und H_2O gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und einrotiert. Der feste Rückstand wird mit PE digeriert, abgesaugt und aus PE/EE umkristallisiert.

Ausbeute: 14,7 g (17 % der Theorie)

Rf = 0,98 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 134 - 136° C (Lit.: 135 - 136° C)

$C_{31}H_{34}N_4O_9$ (606,61)

Ber.: C 61,38 H 5,65 N 9,44
Gef.: C 61,09 H 5,74 N 9,16

N^{δ}, N^{ω}-Bis-benzyloxycarbonyl-L-arginin: 12 g Z(OMe)-Arg(Z)$_2$-OH (19,84 mMol) werden mit 7,2 ml Anisol versetzt und auf -10° C abgekühlt. Sodann werden 34 ml TFA innerhalb 15 Minuten zugetropft. Das Reaktionsgemisch läßt man noch 30 Minuten bei -10° C reagieren und rotiert dann die TFA ein. Der Rückstand wird mit Ether mehrmals digeriert. Zuletzt wird mit Ether überschichtet und langsam soviel THF zugegeben, bis der Sirup gerade in Lösung geht. Nun wird mit TÄA auf pH),5 eingestellt. Der ausgefallene voluminöse Niederschlag wird abgenutscht, mit H_2O dreimal digeriert und wieder abgesaugt. Nach Lösen in heißem MeOH wird während des Abkühlens langsam mit H_2O auf das doppelte Volumen verdünnt. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur fällt das Produkt aus. Getrocknet wird im Vakuum über P_2O_5.

Ausbeute: 6,9 g (76 % der Theorie)
Rf = 0,68 auf CE-Platten in Laufmittel 1
Fp.: 140 - 142° C (Lit.: 143 - 144° C)
$C_{22}H_{24}N_4O_6 \times H_2O$ (458,47)
Ber.: C 57,63 H 5,72 N 12,22
Gef.: C 57,35 H 6,01 N 12,28

N^{δ}, N^{ω}-Bis-benzyloxycarbonyl-L-argininmethylester: In 150 ml MeOH werden 5 g H-Arg(Z)$_2$-OH (10,86 mMol) suspendiert und auf -10° C abgekühlt. Unter heftigem Rühren werden nun 5 ml $SOCl_2$ so langsam zugegeben, daß die Temperatur -5° C nicht

überschreitet. Nach beendeter Zugabe läßt man noch 30 min. bei -5° C rühren. Dann wird das Reaktionsgemisch 6 Stunden bei 40° C gehalten. Die nun klare Lösung wird mehrmals unter jeweiliger Zugabe von MeOH einrotiert. Der Rückstand wird in 100 ml heißem MeOH gelöst und nach Abkühlen vorsichtig mit Ether versetzt. Nach mehrtägigem Stehen bei -20° C fällt das Produkt aus.

Ausbeute: 3,5 g (65% der Theorie)

Rf = 0,76 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 87 - 89° C

$C_{23}H_{28}N_4O_6$ x HCl (492,94)

Ber.: C 56,04 H 5,93 N 11,37 Cl 7,19

Gef.: C 55,84 H 6,11 N 11,13 Cl 7,41

3.2.1.2. N^{ω}-Nitro-L-argininmethylester

L-Arginin-nitrat: 87,1 g Arg (0,5 Mol) werden in einer genau berechneten Menge 5 N HNO_3 gelöst und in einem Wasserbad von 50° C unter Rühren während einer Stunde reagieren lassen. Danach wird bis zur Trockne einrotiert, der Rückstand unter Erwärmen in möglichst wenig Wasser gelöst und zur Fällung mit ca. 1/3 Volumen EtOH versetzt. Das Reaktionsgemisch wird nun 2 Tage im Kühlschrank bei 4° C belassen. Der Ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, mit EtOH und Ether gewaschen und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 98 g (83% der Theorie)

Rf = 0,63 auf CE-Platten in Laufmittel 3

Fp.: 139 - 140° C

$C_6H_{14}N_4O_2 \times HNO_3$ (237,23)

Ber.: C 30,38 H 6,37 N 19,53

Gef.: C 30,19 H 6,54 N 19,79

N^{ω}-Nitro-L-arginin: Bei -60° C werden 45 ml rauchende HNO_3 (86 %), 90 ml konz. H_2SO_4 und 45 ml Oleum (20 % SO_3) zusammengegeben. Zu dieser Mischung werden dann bei -10° C portionsweise 90 g L-Arginin-nitrat (380 mMol) unter heftigem Rühren eingetragen. Es wird solange weitergerührt, bis der entstandene Brei dünnflüssig geworden ist. Dann wird das Reaktionsgemisch auf ca. 2 kg zerstoßenes Eis gegossen. Sobald sich eine klare Lösung ausgebildet hat, wird mit NH_3 zunächst vorsichtig auf pH 8 - 9 eingestellt und dann mit Eisessig auf pH 6. Nach 48 Stunden Stehen bei 4° C wird der ausgefallene Niederschlag abgenutscht, aus heißem H_2O umkristallisiert und zuerst mit EtOH, dann mit Ether gewaschen. Getrocknet wird im Exsikkator über P_2O_5.

Ausbeute: 72,5 g (87 % der Theorie)

Rf = 0,38 auf CE-Platten in Laufmittel 2

Fp.: 254 - 256° C (Lit.: 255° C)

$C_6H_{13}N_5O_4$ (219,21)

Ber.: C 32,87 H 5,98 N 25,56

Gef.: C 32,66 H 6,14 N 25,73

N^{ω}-Nitro-L-argininmethylester: 10 g H-Arg(NO_2)-OH (45,6 mMol) werden in 150 ml MeOH suspendiert und durch die Suspension während einer Stunde ein HCl-Strom geleitet. Danach wirdeinrotiert, der Rückstand in 100 ml MeOH abs. aufgenommen und erneut eine Stunde lang mit HCl begast. Nach dem Einrotieren wird in 40 ml MeOH gelöst und bis zur beginnenden Trübung mit Ether versetzt. Nach mehrtägigem Stehen bei -20° C und sorgfältiger Zugabe von Ether kristallisiert das Produkt als Hydrochlorid aus.

Ausbeute: 10,7 g (87 % der Theorie)

Rf = 0,68 auf CE-Platten in Laufmittel 1

Fp.: 156 - 158° C (Lit.: 159 - 161° C (85); 157 - 158° C (68))

$C_7H_{16}O_4N_5Cl$ (269,68)

Ber.: C 31,17 H 5,98 N 25,97 Cl 13,16

Gef.: C 31,41 H 5,77 N 26,31 Cl 12,85

3.2.2. N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycin

N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-glycin: In einem siedenen Wasserbad werden 97 ml 2-Chlorethanol (1000 mMol) auf 100° C erhitzt und aus einem Tropftrichter mit Druckausgleich eine Lösung von 33,3 g NaOH (800 mMol) in 35 ml H_2O während einer Stunde zutropfen lassen. Das dabei entstehende Ethylenoxid Kp_{760}: 10,56° C) wird sofort nach seiner Bildung über ein Gaseinleitungsrohr in das eisgekühlte Reaktionsgefäß eingeleitet. Dieses enthält 30 g Gly (400 mMol) in 500 ml H_2O gelöst und zusätzlich 63 g $Ba(OH)_2 \times 8\ H_2O$ (200 mMol) suspendiert.
Die Ethylenoxid-Einleitung ist beendet, wenn im Reaktionskolben die Reaktionslösung im Einleitungsrohr wegen des in der Chlorethanol-Vorlage entstehenden Unterdrucks aufzusteigen beginnt. Nun werden Reaktionskolben und Chlorethanol-Vorlage über einen Dreiweghahn belüftet, um ein Rückschlagen zu verhindern.
Die Reaktionslösung wird noch einen Tag bei Raumtemperatur weitergerührt. Dann wird vom ausgefallenen Ba-Salz abgenutscht und der Rückstand mit der dem eingesetzten $Ba(OH)_2 \times 8\ H_2O$ äquimolaren Menge $2\,N\,H_2SO_4$ versetzt. Das ausgefallene $BaSO_4$ wird abzentrifugiert, der Überstand einrotiert, in 300 ml EtOH aufgenommen und mit EE gefällt. Umkristallisiert wird aus MeOH/Ether.

Ausbeute: 54,2 g (83% der Theorie)
Rf = 0,76 auf CE-Platten in Laufmittel 4
$C_6H_{13}NO_4$ (163,17) Fp.: 192 - 193° C (Lit.: 191 - 194° C)
Ber.: C 44,16 H 8,03 N 8,58
Gef.: C 44,06 H 8,03 N 8,41

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycin: 32,6 g $(HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Gly (200 mMol) werden in 600 ml THF und 100 ml Pyridin gelöst. In dieser Lösung werden zusätzlich 30,5 g $Ba(OH)_2 \times 8\ H_2O$ suspendiert (100 mMol) und der Reaktionsansatz in einem EtOH-Trockeneisbad auf -60 bis -70° C abgekühlt. Unter intensivem Rühren (KPG-Rührer) werden nun 45 ml Thionylchlorid (600 mMol), in 55 ml THF gelöst, langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird noch 24 Stunden bei -60 bis -70° C weitergerührt. Nach Reaktionsende wird das überschüssige Thionylchlorid unter vorsichtiger Zugabe eines Überschusses H_2O zerstört (heftiges Schäumen!). Danach wird einrotiert, der intensiv gelb gefärbte Rückstand in 600 ml H_2O aufgenommen und mit 200 ml 1 N H_2SO_4 versetzt. Vom ausgefallenen $BaSO_4$ wird abzentrifugiert und der Überstand je dreimal mit EE und Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wird über Aktivkohle gereinigt und dann unter mehrmaliger Zugabe von Methylethylketon vollständig einrotiert. Das verbleibende zähflüssige, gelbe Öl wird zunächst mit Ether digeriert, im Exsikkator über P_2O_5 mehrere Tage getrocknet und anschließend in 50 ml THF aufgenommen. Nach Zusatz von 300 ml Dioxan bilden sich zwei Phasen aus. Die untere Phase (NBP-positiv) wird abgetrennt, einrotiert, in MeOH aufgenommen und das Produkt bei -60 bis -70° C unter vorsichtigem Hinzufügen von EE gefällt. Nach einwöchigem Stehen bei Raumtemperatur scheiden sich aus dem ausgefallenen Ölschmierige Kristalle ab. Durch Kühlung auf -70° C wird die Kristallisation beschleunigt. Der abgeschiedene Kristallbrei wird abgesaugt und im Exsikkator über Nacht getrocknet. Dabei zerfließen die Kristalle zu einer amorphen Masse. Diese wird mehrmals mit einer Lösung von HCl in $CHCl_3$

(0,5 N) digeriert und erneut im Exsikkator getrocknet. Zuletzt wird in wenig MeOH gelöst und unter Zusatz von Ether das Produkt als Hydrochlorid gefällt. Beim Trocknen im Exsikkator über P_2O_5 wird das amorphe Pulver langsam zähflüssig. Nach zweiwöchigem Stehen bei Raumtemperatur scheiden sich daraus langsam große Kristalle ab.

Ausbeute: 6,1 g (13% der Theorie)
Rf = 0,73 auf CE-Platten in Laufmittel 4
Fp.: 114 - 116° C (Lit.: 108 - 110° C)
$C_6H_{11}NO_2Cl_2$ x HCl (236,51)

Ber.:	C 30,47	H 5,11	N 5,92	Cl 44,97
Gef.:	C 30,25	H 5,34	N 5,69	Cl 45,25

3.2.3. N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycyl-arginin

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-argininmethylester: 7,5 g H-Arg(Z)$_2$-OMe x HCl (15 mMol) werden in 100 ml DMF gelöst und 1 ml TÄA zugesetzt. Bei -10° C läßt man langsam 10 ml Chlorameisensäureisobutylester zutropfen. Nach 30 min. Rühren werden 3,55 g $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Gly-OH x HCl eingetragen. Über Nacht läßt man weiterrühren, wobei sich das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt.
Vom Ungelösten wird abgenutscht, Das Filtrat unter mehrmaliger Zugabe von EtOH einrotiert und in Chloroform aufgenommen. Die Chloroform-Phase wird je dreimal mit 5% $NaHSO_4$-Lösung, 5% $NaHCO_3$-Lösung und H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und über Aktivkohle gereinigt. Nach Abziehen des Chloroforms wird unter gelindem Erwärmen in EtOH gelöst und unter sorg-

fältoger Zugabe von n-Hexan gefällt. Aus $CHCl_3$/n-Heptan wird umgefällt.

Ausbeute: 5,8 g (60 % der Theorie)

Rf = 0,78 auf CE-Platten in Laufmittel 4

Fp.: 92 - 96° C (zers.)

$C_{29}H_{37}N_5O_7Cl_2$ (638,55)

Ber.: C 54,55 H 5,84 N 10,97 Cl 11,1

Gef.: C 54,93 H 5,94 N 10,59 Cl 10,69

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycyl-N^{δ},N^{ω}-bis-benzyloxycarbonyl-arginin: 5,1 g $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Gly-Arg(Z)$_2$-OMe werden in 50 ml 50 % methanolischer Lösung, die 0,5 molar an NaOH ist, suspendiert und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Versetzen mit 5 ml AcOH wird einrotiert. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, die EE-Phase mit 5 % $NaHCO_3$-Lösung und H_2O gewaschen und mit $MgSO_4$/Aktivkohle getrocknet. Mit PE wird gefällt.

Ausbeute: 4,2 g (83 % der Theorie)

Rf = 0,81 auf CE-Platten in Laufmittel 4

$C_{28}H_{33}N_5O_7Cl_2$ (622,51)

Ber.: C 54,02 H 5,34 N 11,25 Cl 11,39

Gef.: C 54,39 H 5,56 N 10,87 Cl 11,05

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycyl-arginin: 3,8 g (6 mMol) $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Gly-Arg(Z)$_2$-OH werden in einer Mischung aus 20 ml AcOH und 10 ml MeOH gelöst und 12 Stunden bei 3 - 5 bar in der Hydrierapparatur über Pd/C hydriert. Nach mehrmaligem Einrotieren unter Zugabe von EtOH wird zuletzt in wenig ethanolischer HCl aufgenommen und unter vorsichtigem Hinzu-

fügen von Ether das Produkt ausgefällt. Das resultierende zähflüssige Öl konnte auch nach mehrmaligem Umfällen und Einrotieren nur als fester Schaum erhalten werden

Ausbeute: 2,5 g (ca. 91 % der Theorie)

Rf = 0,89 auf CE-Platten in Laufmittel 4

$C_{12}H_{23}N_5O_3Cl_2$ x 2 HCl (429,17)

Ber.: C 33,58 H 5,87 N 16,32 Cl 33,04

Gef.: C 33,91 H 6,14 N 15,97 Cl 33,40

3.2.4. N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanin

N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-phenylalanin: 82,6 g Phe (500 mMol) werden zusammen mit 78,87 g $Ba(OH)_2 \times 8\ H_2O$ in 600 ml H_2O suspendiert. In diese Suspension wird bei 0° C Ethylenoxid eingeleitet, welches aus 60 g NaOH in 60 ml H_2O und 180 ml 2-Chlorethanol, wie in 3.2.2. beschrieben, gebildet wird. Nach beendeter Einleitung wird noch 24 Stunden bei 0° C weitergerührt. Danach wird vom ausgefallenen Ba-Salz des Produkts abfiltriert und mit kaltem EtOH nachgewaschen. Sodann wird der Niederschlag in 500 ml H_2O suspendiert und 500 ml 2 N H_2SO_4 zugesetzt. Vom ausgefallenen $BaSO_4$ wird abzentrifugiert, der Überstand einrotiert und in 500 ml EtOH aufgenommen. Unter Zugabe von EE wird vorsichtig gefällt. Umkristallisiert wird aus EtOH/EE.

Ausbeute: 87 g (68,7 % der Theorie)

Rf = 0,88 auf CE-Platten in Laufmittel 4

$C_{13}H_{19}NO_4$ (253,29) Fp.: 215 - 218° C (zers.)

Ber.: C 61,64 H 7,56 N 5,53

Gef.: C 61,66 H 7,59 N 5,57

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanin: Verfahren wird analog der Vorschrift in 3.2.2.

Ausbeute: 16,26 g (21 % der Theorie)

Rf = 0,73 auf CE-Platten in Laufmittel 4

$C_{13}H_{17}NO_2Cl_2 \times HCl$ (326,63) Fp.: 117 - 120° C

Ber.: C 47,80 H 5,55 N 4,29 Cl 32,56

Gef.: C 47,59 H 5,61 N 4,02 Cl 32,83

3.2.5. N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanyl-arginin

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanyl-N^{ω}-nitro-argininmethylester: 5,4 g H-Arg(NO_2)-OMe x HCl (20 mMol) werden in 100 ml Dioxan gelöst, 0,7 ml TÄA zugegeben und nach Abkühlen auf -15° C 10 ml Chlorameisensäureisobutylester zugetropft. Nach 20 min. Rühren werden 3,3 g $(Cl-CH_2-CH_2)_2$-Phe-OH, in wenig Dioxan gelöst, eingetragen. Über Nacht wird weitergerührt. Vom Ungelösten wird abgenutscht, das Filtrat einrotiert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Die Chloroform-Phase wird mit $NaHSO_4$-Lösung, Bicarbonat-Lösung und H_2O gewaschen, mit Aktivkohle gereinigt und über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Schließlich wird das Chloroform abrotiert, der Rückstand in Ether aufgenommen, von etwas Ungelöstem abfiltriert und unter vorsichtiger Zugabe von n-Hexan gefällt. Die ausgefallene schmierige, amorphe Masse ließ sich auch nach mehrmaligem Umfällen nicht in fester Form erhalten.

Ausbeute: ca. 6,5 G (ca. 65% der Theorie)
Rf = 0,95 auf CE-Platten in Laufmittel 4
$C_{20}H_{30}N_6O_5Cl_2$ (505,4)

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanyl-N^{ω}-nitro-arginin: 6 g des obigen Produktes ($(Cl-CH_2-CH_2)_2$-Phe-Arg(NO_2)-OMe, ca. 12 mMol) werden in einer Mischung von 25 ml MeOH und 25 ml 1 N NaOH gelöst und 3 Stunden gerührt. Danach wird mit 5 ml AcOH versetzt und mehrmals unter Zugabe von EtOH einrotiert. Schließlich wird in Chloroform gelöst, die Chloroform-Phase mit Bicarbonat-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Einrotieren

wird mit heißem EtOH aufgenommen und nach Erkalten mit n-Hexan gefällt. Das Produkt fällt dabei als zähe Masse aus. Nach mehrtägigem Stehen im Exsikkator unter Vakuum bildet sich daraus ein stabiler Schaum.

Ausbeute: 5,4 g (92 % der Theorie)

Rf = 0,9 auf CE-Platten in Laufmittel 4

$C_{19}H_{28}N_6O_5Cl_2$ (491,38) Fp.: 87 - 93° C

Ber.: C 46,44 H 5,74 N 17,10 Cl 14,43

Gef.: C 46,93 H 6,13 N 16,48 Cl 13,98

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanyl-arginin: 5,4 g $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Phe-Arg($NO_2$)-OH (11 mMol) werden in 30 ml HOAc und 10 ml MeOH gemäß der Vorschrift in 3.2.3. katalytisch hydriert. Auch nach wiederholtem Fällen aus EtOH/Ether konnte das Produkt nur als fester Schaum erhalten werden.

Ausbeute: 2,5 g (ca. 90 % der Theorie)

Chromatographisch einheitlich in den Laufmitteln 1,2,4

Rf = 0,87 auf CE-Platten in Laufmittel 4

$C_{19}H_{29}N_5O_3Cl_2 \times 2\ HCl$ (519,28)

Ber.: C 43,94 H 6,02 N 13,49 Cl 27,31

Gef.: C 43,41 H 6,53 N 12,98 Cl 27,61

3.2.6. N^{α}-N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-arginin

N^{α},N^{α}-Bis-(2-hydroxyethyl)-N^{ω}-nitro-arginin: 21,9 g Nitro-Arg (100 mMol) werden zusammen mit 15,8 g $Ba(OH)_2 \times 8\,H_2O$ in 500 ml H_2O unter Rühren auf ca. 80°C erwärmt. Nach erfolgter Lösung wird das Reaktionsgemisch noch eine Stunde bei dieser Temperatur gehalten. Dann läßt man unter heftigem Rühren langsam auf

ca. 4° C abkühlen und hydroxyethyliert unter Eiskühlung wie in 3.2.2. beschrieben. Umkristallisiert wird aus Et/EE.

Ausbeute: 14,8 g (48 % der Theorie)

Rf = 0,87 auf CE-Platten in Laufmittel 4

Fp.: 199 - 202° C

$C_{10}H_{21}N_5O_6$ (307,30)

Ber.: C 39,08 H 6,89 N 22,79

Gef.: C 39,21 H 7,12 N 22,57

<u>N^{α},N^{α}-Bis-(2-hydroxyethyl)-arginin</u>:

14,8 g $(HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Arg$(NO_2)$-OH (48 mMol) werden an Pd/C gemäß der Vorschrift in 3.2.3. katalytisch hydriert. Aus der ethanolischen Lösung wird mit EE. unter Zugabe von etwas Ether gefällt. Umgefällt wird aus EtOH/Ether.

Ausbeute: 12,2 g (95 % der Theorie)

Rf = 0,84 auf CE-Platten in Laufmittel 4

Fp.: 148 - 150° C

$C_{10}H_{22}N_4O_4$ (262,31)

Ber.: C 45,79 H 8,45 N 21,36

Gef.: C 45,88 H 8,34 N 21,53

<u>N^{α},N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-arginin</u>: 12 g $(HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Arg-OH (45,7 mMol) werden nach der Vorschrift in 3.2.2. mit Thionylchlorid chloriert (20 ml). Das ausfallende ölige Produkt konnte nicht in feste Form überführt werden. Nach mehrtägigem Stehen im Exsikkator und Aufenthalt in der Trockenpistole blieb ein stabiler Schaum.

Ausbeute: 2,95 g (ca. 10 % der Theorie)

Chromatographisch rein in den Laufmitteln 1,2,4

Rf = 0,81 auf CE-Platten in Laufmittel 4

$C_{10}H_{20}N_4O_2Cl_2 \times 2\,HCl$ (372,12)

Ber.: C 32,27 H 5,96 N 15,06 Cl 38,11

Gef.: C 31,73 H 6,54 N 14,63 Cl 37,61

4. BESCHREIBUNG DER BIOLOGISCHEN TESTS

4.1. Tests für ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen

4.1.1. 1-^{14}C-Glucoseoxidation an isolierten Fettzellen des epididymalen Fettgewebes der Ratte

Lösungen:

Puffer I (zur Zellaufbereitung)

5,1 g NaCl
1,94 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
2,4 g Tris
0,1 g Glucose

Man löst ad 500 ml in aqua bidest. und stellt den pH-Wert mit conc. HCl auf 7,8 ein.

Zum Gebrauch: 5,0 ml Puffer I
3,5 ml 10%ige Albuminlösung
1,5 ml aqua bidest.

Der pH-Wert muß kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt werden.

Puffer II (zur Inkubation)

3,5 g NaCl
1,94 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
2,4 g Tris
0,1 g Glucose

Man löst ad 500 ml aqua bidest. und stellt den pH-Wert mit conc. HCl auf 7,2 ein.

Zum Gebrauch: 5,0 ml Puffer II
2,0 ml 10%ige Albuminlösung
3,0 ml aqua bidest.

Der pH-Wert muß kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt werden.

Bicarbonat-Lösung: 2,112 g $NaHCO_3$
ad 100 ml in bidest. Wasser gelöst.

Zum Gebrauch: Die Lösung muß immer vor Versuchsbeginn frisch angesetzt werden. Vor dem Pipettieren wird sie auf 37°C erwärmt.

10%ige Albuminlösung: 10 g Humanalbumin werden in 50 ml aqua bidest. gelöst und zwei Tage gegen öfter gewechseltes bidest. Wasser dialysiert. Dann werden pro 70 ml 3,5 g Aktivkohle zugesetzt (87), der pH-Wert auf 3,0 eingestellt und eine Stunde auf dem Magnetrührer gerührt. Die Aktivkohle wird danach in einer Ultrazentrifuge bei ca. 15000 g abzentrifugiert. Zuletzt wird das pH mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Danach wird der pH-Wert korrigiert und die Lösung mit aqua bidest. ad 100 ml aufgefüllt.

Szintillator-Lösung:
5 g PPO und 100 mg POPOP werden in 1000 ml Toluol gelöst.

Gewinnung der Fettzellen: Von 120 - 150 g schweren Ratten (männlich) werden die Nebenhodenfettkörper sofort nach der Tötung entfernt und daraus in Anlehnung an RODBELL (88) die Fettzellen gewonnen. Anstelle des KREBS-HENSELEIT-Hydrogenkarbonatpuffers wird ein Tris-Puffer (pH 7,8) nach HEPTNER und CHRIST verwandt (89), dem nach GLIEMANN 3,5 g Albumin und 10 mg Glucose je 100 ml zugesetzt werden (90,91)

In 3 ml Puffer I werden 4,5 mg Kollagenase gelöst und 1,5 g Nebenhodenfettgewebe zugegeben. Die Probe wird 1 Minute mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) begast, schnell verschlossen und unter Schütteln 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die freigesetzten Fettzellen werden durch ein mit bidest. H_2O gewaschenes Nylonnetz vom restlichen Gewebe abgetrennt, in ein Zentrifugenglas gegeben und ca. 15 Sekunden bei 50 - 70 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird zur Entfernung des Kollagens viermal mit auf 37°C erwärmtem Puffer II gewaschen. Hierzu werden die Zellen jeweils ca. 8 Sekunden bei geringer Tourenzahl zentrifugiert, das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml Puffer II aufgewirbelt und erneut zentrifugiert. Zuletzt wird das Zellpräzipitat in 5 ml Puffer II aufgenommen, suspendiert und 0,4 ml der Zellsuspension mit Puffer II ad 15 ml verdünnt und sofort pipettiert. Um die Zellen in gleichmäßiger Suspension zu halten, werden diese während des Pipettierens bei 37°C schonend gerührt.

Messung der CO_2-Produktion: Der Inkubationsansatz von insgesamt 2,5 ml setzt sich wie folgt zusammen:

1,1 ml Puffer II mit 0,5 µCi 1-^{14}C-Glucose
0,2 ml Insulin bzw. Testlösung
1 ml Zellsuspension (ca. 10^6 Fettzellen pro ml)
0,2 ml 0,25 M $NaHCO_3$-Lösung

Die Lösungen werden in der angegebenen Reihenfolge in Polystyrolröhrchen pipettiert und diese sofort mit einem Gummistopfen verschlossen, an dem jeweils mit Draht ein kleines Zentrifugengläschen derart befestigt ist, daß es in den freien Raum des Probenröhrchens hineinhängen kann. Durch den Gummistopfen sollten mit einer Injektionsspritze nachträglich Lösungen ohne Gasverlust zugegeben werden können. Nun wird 2 Stunden

bei 37°C unter mäßigem Schütteln inkubiert. Danach werden die an der Gummikappe befestigten Gläschen mit Hilfe einer Spritze mit 0,4 ml Hyamin beschickt, um das entwickelte CO_2 zu absorbieren. Daran anschließend werden 0,2 ml 10%ige H_2SO_4 in das Medium injiziert, um damit die Reaktion zu stoppen und das CO_2 vollständig auszutreiben. Man inkubiert noch weitere 2 Stunden unter mäßigem Schütteln, entnimmt dann vorsichtig die mit Hyamin beschickten Gläschen und überführt die Hyaminlösung in Szintillatorgläschen mit 10 ml Toluol-Szintillator. Die Zählrate des $^{14}CO_2$ wird durch 10-minütiges Messen im Liquid-Scintillation-Counter ermittelt- Als Kontrolle dienen analog behandelte Ansätze ohne Zugabe von Wirkstoffen.

4.1.2. In-vivo-Messungen der U-^{14}C-Glucoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe der Maus

Lösungen:

Injektionslösung: Testsubstanz bzw. Insulin in 1,88 ml 0,9% NaCl lösen, 0,12 ml U-^{14}C-Glucose-Lösung (10 µCi/ml) zugeben.

Oxidationsgemisch: 33 ml Perchlorsäure (70%)
67 ml Wasserstoffperoxid (30%)

Szintillatorgemisch: 6 g PPO, gelöst in Mischung von 1 l Cellosolve und 1 l Toluol.

Durchführung:

Weibliche Mäuse (Stamm NMRI, Versuchstierzuchtanstalt Tuttlingen) von ca. 20 - 25 g Gewicht werden 24 Stunden nüchtern gesetzt. Sodann werden jeweils 3 Mäusen intraperitoneal 0,5 ml isotonische Injektionslösung appliziert, die neben der gewünschten

Konzentration an Insulin bzw. Testsubstanz 0,6 /uCi U-^{14}C-Glucose pro ml enthält. Nach der Injektion sollten die Mäuse wegen $^{14}CO_2$-Expiration unter dem Abzug aufbewahrt werden. Nach 120 Minuten werden die Tiere durch Dekapitieren getötet. Das Blut jeder Maus wird sogleich einzeln in heparinisierten Plastikgefäßen für die Blutzucker-Bestimmung (siehe 4.1.3.) aufgefangen. Anschließend werden jeweils Epididymis und Zwerchfell entnommen, ausgewogen und einzeln in Szintillationsgefäße gegeben. Jedes Röhrchen wird mit 0,6 ml Oxidationslösung beschickt und 60 Minuten in einem Wasserbad von 60°C inkubiert. Darauf füllt man die Gläschen mit 20 ml Szintillatorgemisch auf und bestimmt die Zählraten im Liquid-Scintillation-Counter.

4.1.3. Enzymatische Blutzucker-Bestimmung der Maus

Lösungen:

I Puffer-Enzym-Lösung: 0,6 g KH_2PO_4
0,83 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$
4 mg POD
25 mg GOD

Man löst ad 100 ml in aqua bidest. und stellt den pH-Wert auf 7,0 ein.

II Glucose-Standard-Lösung: 91 mg Glucose in 1000 ml aqua bidest gelöst.

III Chromogen-Lösung: 132 mg o-Dianisidin · HCl in 20 ml aqua bidest. gelöst.

IV Glucose-Reagenz: 50 ml Lösung I und 500 ml Lösung III unter kräftigem Rühren gemischt.

V Zur Enteiweißung: 2,85 ml Perchlorsäure (70%) mit aqua bidest. ad 100 ml aufgefüllt.

Von jeder der nach 4.1.2. gewonnenen Blutchargen werden 0,5 ml zur Enteiweißung mit 5ml Lösung V versetzt, kurz geschüttelt und filtriert. Dann werden jeweils 200 µl der Filtrate und als Standard 200 µl Lösung II mit 5ml Lösung IV vermischt (Leerwert: 200 µl aqua bidest. und 5ml Lösung IV) und bei 37°C inkubiert. Nach 20 Minuten werden die Extinktionen der Proben und des Standards bei 460 nm gegen den Leerwert gemessen. Da in dem Reaktionsansatz für den Standard (5,2 ml) 18,2 µg Glucose enthalten sind, was einer Konzentration von 100 mg pro 100 ml entspricht, so errechnet sich die jeweilige Blutglucosekonzentration der Proben, ausgedrückt in mg pro 100 ml, als das 100-fache des Quotienten aus Probe- zu Standardextinktion.

4.2. In-vitro-Test für chlorethylierte Verbindungen

Lösungen:

Vollmedium: siehe Tabelle 1

0,9%ige NaCl-Lösung

5% TCA/4 Vol% Na-Pyrophosphat-Lösung: 50 g TCA werden in 500 ml H_2O gelöst. Bei 0°C werden 40 ml gesättigte Na-Pyrophosphat-Lösung zugegeben und ad 1000 ml mit H_2O aufgefüllt.

Szintillatorgemisch: 5 g PPO und 0,1 g POPOP werden in dest. Toluol gelöst und ad 1000 ml aufgefüllt.

Tabelle 1 Zusammensetzung des TC 199 - Fertigmediums für den in-vitro-Test mit EHRLICH-Ascites-Zellen (alle Angaben in mg/l)

L-Alanin	25	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	200
L-Arginin HCl	70	NaCl	8000
L-Asparaginsäure	30	$NaCOOCH_3$	50
L-Cystein HCl	0,1	$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	60
L-Cystin 2 HCl	26	Phenol red.	20
L-Glutamin	100		
L-Glutaminsäure	75	Adenin	10
Glycin	50	Adenosin-	
L-Histidin	20	triphosphat 2 Na	1
L-Hydroxyprolin	10	Adenosinmonophosphat	0,2
L-Isoleucin	20	Cholesterin	0,2
L-Leucin	60	Desoxyribose	0,5
L-Lysin HCl	70	Dextrose	1000
L-Methionin	15	Glutathion	0,05
L-Phenylalanin	25	Guanin HCl	0,3
L-Prolin	40	Hypoxanthin	0,3
L-Serin	25	Ribose	0,5
L-Threonin	30	Thymin	0,3
L-Tryptophan	10	Tween 80	5
L-Tyrosin	40	Uracil	0,3
L-Valin	25	Xanthin	0,3
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	185	Ascorbinsäure	0,05
$Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$	0,168	Vitamin A	0,1
KCl	400	D-Biotin	0,01
KH_2PO_4	60	Calciferol	0,1

Fortsetzung Tabelle 1

D-Calcium-Pantothenat	0,01	Nicotinamid	0,025
Cholin Cl	0,5	p-Aminobenzoesäure	0,05
Folsäure	0,01	Pyridoxal HCl	0,025
Inosit	0,05	Pyridoxin HCl	0,025
Menadion	0,01	Roboflavin	0,01
Nicotinsäure	0,025	Thiamin HCl	0,01
		α-Tocopherol	0,01

Zum Fertigmedium werden noch zusätzlich 450 mg/l HEPES gegeben und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Versuchstiere: Als Versuchstiere dienten weibliche Reinzuchtmäuse des Stammes NMRI. Die Mäuse wurden in Gruppen von zwei bis fünf Tieren in Makrolon-Käfigen mit einer Bodenfläche von 400 cm^2 gehalten. Im Tierstall herrschte eine Temperatur von 23 - 25°C bei ca. 60% relat. Luftfeuchtigkeit. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden. Als Standarddiät diente Altromin^R und Leitungswasser ad libitum.

Gewinnung der Ascites-Zellsuspension: Zur Passage der Ascites-Zellen werden einer Spendermaus (Inokulation 10 Tage zuvor) unter Äthernarkose Ascites-Flüssigkeit aus der Peritonealhöhle abpunktiert und davon je 0,4 ml in die Bauchhöhle von 20 - 25 g schweren Mäusen injiziert. Diese Tiere werden nach 3 Tagen durch Fraktur der Halswirbelsäule getötet. In die Bauchhöhle werden nun zusätzlich je 10 ml auf 37°C erwärmtes Vollmedium und 50 I.E. Heparin injiziert, wobei auf gute Durchmischung mit der Ascites-Flüssigkeit geachtet wird. Nach Aufreißen des

Fells wird die Bauchdecke über einem Becherglas aufgeschnitten und die Bauchhöhle entleert. Pro Versuch werden 2 Mäuse verwendet, deren Zellen mit Vollmedium zunächst auf jeweils 100 ml verdünnt werden. Nach dem Auszählen der Zellen in einer THOMA-Zählkammer wird der Titer mit Vollmedium auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Messung der Einbauraten von ^{14}C-Thymidin, -Uridin und -Leucin: 10 ml der obigen Zellsuspension werden mit 10 ml Vollmedium, dem die Testsubstanz in der gewünschten Konzentration zugesetzt wird (Kontrolle ohne Zusatz), zu einem Ansatz vereinigt und bei 37°C in einer WARBURG-Apparatur geschüttelt, um eine Sedimentation der Zellen zu verhindern (Zeitpunkt: 0 min.). Die Gesamtinkubationszeit dauert 120 min. bei einem pH-Wert von 7,4.

Als Zusätze wurden gegeben:

a) die chlorethylierten Verbindungen $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Gly-OH und $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Phe-OH in den Konzentrationen 10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 7×10^{-4} M und 10^{-3} M

b) die hydroxyethylierten Verbindungen $(HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Gly-OH und $(HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Phe-OH in den Konzentrationen 10^{-4} M und 5×10^{-4} M

c) die einfach chlorethylierte Verbindung N-(2-chlorethyl)-N,N-dimethylammoniumchlorid in den Konzentrationen 10^{-4} M und 5×10^{-4} M

d) die bischlorethylierten Verbindungen $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Arg-OH, $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Gly-Arg-OH und $(Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_2$-Phe-Arg-OH in der Konzentration 5×10^{-5} M.

Zur Bestimmung des ^{14}C-Thymidin, -Uridin und -Leucin-Einbaus werden je 0,1 µCi der 3 markierten Verbindungen getrennt in

3 Einwegreagenzgläser gegeben. Nach 10, 40, 70 und 100 min. werden 3 ml Zellsuspension entnommen und davon je 1ml in die Reagenzgläser mit den radioaktiv markierten Verbindungen eingetragen. Diese werden sodann für jeden Meßzeitpunkt 20 min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert, sodaß die Gesamtzeit der Inkubation jeweils 30, 60, 90 und 120 min. beträgt.
Danach werden die Ansätze durch Zugabe von je 5ml eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung gestoppt und 6 min. in der Stockzentrifuge bei niedrigster Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wird der Zellrückstand mit je 8 ml eiskalter 5% TCA/4 Vol.% Na-Pyrophosphatlösung versetzt und 30 min. im Eisbad belassen.
Nach kurzem Homogenisieren wird die Zellsuspension mit der Wasserstrahlpumpe auf ein Miliiporefilter abgesaugt und zweimal mit je 4 ml eiskalter 5% TCA/4 Vol.% Na-Pyrophosphatlösung nachgespült. Die einzelnen Filter werden sodann 20 min. bei 90°C getrocknet, in Szintillatorgefäße eingebracht, mit je 20 ml Toluol-Szintillator beschickt und ihre cpm während 10 min. im Liquidszintillation-Counter bestimmt.

5. ERGEBNISSE

5.1. Synthesen der Verbindungen

5.1.1. ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen und Analoga

Die Verbindungen 4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid
5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid
6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid
11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid

wurden in folgenden Schritten synthetisiert:

1) Kopplung der entsprechenden Z-geschützten ω-Aminocarbonsäure (92) an Phenylalaninmethylester (44) mit N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (55-58) unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol (59-61).

2) Verseifung des Methylesters mit 1 N NaOH (93).

3) Überführung der freien Carboxylgruppe in das Dimethylamid mit Dimethylamin und Chlorameisensäureisobutylester nach der "Gemischten-Anhydrid-Methode" (46 - 50).

4) Abspaltung der Z-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung an Pd/C (94,95).

5) Amidinierung der freien Aminogruppe mit 3,5-Dimethylpyrazolyl-formaminidiniumnitrat (53, 96).

Der hier eingeschlagene Syntheseweg stellt, wenn von den freien Aminosäuren ausgegangen wird, mit insgesamt sieben Reaktionsschritten zwar die längste aller möglichen Varianten dar, bietet aber entscheidende Vorteile.

Der Aufbau der Carbonamidgruppe, ausgehend von der freien Carboxylgruppe und Dimethylamin, erweist sich gegenüber einer direk-

ten Ammonolyse des Methylesters wegen höherer Ausbeuten und wesentlich kürzerer Reaktionszeiten überlegen.
Eine direkte Kopplung der entsprechenden ω-Guanidinocarbonsäuren an Phenylalanindimethylamid bzw. PheOMe mit DCCI/HOBt ist zwar möglich, doch war die Abtrennung des Kopplungsprodukts von nicht umgesetzten freien ω-Guanidinocarbonsäuren schwierig und zeitaufwendig (41). Hingegen verläuft der Umweg über Z-geschützte ω-Aminocarbonsäuren und der Aufbau der Guanandino-Gruppe nach der Kopplung problemlos.
Zur Überführung der Amino- in die Guanidino-Gruppe wurde DPF eingesetzt (53,96), weil sich damit höhere Ausbeuten und bessere Aufarbeitung des Produkts erzielen ließ als mit O-Methylisoharnstoffsulfat als Aminidierungsreagenz (52).

Auf die gleiche Weise wurden die Verbindungen

1-Guanidino-3-phenylpropan und

1-Guanidino-4-phenylbutan

unmittelbar aus ihren entsprechenden Aminen gewonnen.

Die Verbindung Arg-Gly-Phe-Phe-$N(CH_3)_2$ wurde in folgenden Schritten synthetisiert:

1) Kopplung von Z-Phe-OH an H-PHe-OMe mit der DCCI-Methode (55 - 58).
2) Katalytische Abspaltung des Z-Rests mit Pd/C (94,95).
3) Kopplung von Boc-Gly-OH an H-Phe-Phe-OMe mittels der DCCI/HOBt-Methode (60,61).
4) Abspaltung der Boc-Gruppe mit HCl/AcOH (97).
5) Kopplung von Z-$Arg(Z)_2$-OH an H-Gly-Phe-Phe-OMe über die Methode der aktivierten Ester (62).

6) Verseifung des Methylesters am Carboxylende (93).

7) Kopplung von Dimethylamin an Z-Arg(Z)$_2$-Gly-Phe-Phe-OH nach der Methode der gemischten Anhydride (46-50).

8) Katalytische Abspaltung der drei Z-Gruppen mit Pd/C.

5.1.2. Chlorethylierte Verbindungen

Die Chlorethylierung der Aminosäuren Gly, Phe und Arg erfolgte in zwei Stufen:

1) Hydroxyethylierung an der freien α-Aminogruppe nach einem Verfahren von KNORR mit Ethylenoxyid (98). Im Falle des Arg war die Guanidinofunktion mit der Nitrogruppe geschützt.

2) Substitution der beiden Hydroxylgruppen durch Cl mittels $SOCl_2$. Dieses hat gegenüber den Phosphorhalogeniden PCl_3 und PCl_5 den Vorteil, nur leicht flüchtige Umwandlungsprodukte zu liefern, nämlich SO_2 und HCl.

Darstellung von Ethylenoxid: Nach ZIMAKOV und KOGAN wird Ethylenoxid aus 2-Chlorethanol und NaOH gewonnen (99). Im Prinzip handelt es sich dabei um die Abspaltung von HCl aus 1,2-Halogenhydrin:

Nach den Untersuchungen obengenannter Autoren über die optimalen Reaktionsbedingungen ergeben sich folgende Kriterien: 1) Chlorethanol im Überschuß; 2) möglichst konzentrierte Lösung von NaOH; 3) möglichst kurze Berührungszeit des gebildeten Ethylenoxids mit der Chlorethanol-Lösung.

Die Umsetzung zu Ethylenoxid verläuft i.a. schon bei Raumtemperatur ziemlich quantitativ. Es sollte mit möglichst reinen

Substanzen gearbeitet werden, da das sehr reaktionsfähige Ethylenoxid mit Verunreinigungen leicht Nebenreaktionen eingeht oder in stark exothermer Reaktion zu Acetaldehyd reagiert. 2-Chlorethanol wirkt dabei jedoch stabilisierend. Ein Überschuß an NaOH sollte auf jeden Fall vermieden werden, da sonst bei der in dieser Reaktion gewählten Temperatur von 100°C explosionsartige Umsetzung eintreten kann. Das Ausmaß der Reaktion kann anhand des ausfallenden NaCl, welches in 2-Chlorethanol unlöslich ist, verfolgt werden.

Hydroxyethylierung der Aminosäuren Gly, Phe und Arg: Ethylenoxid wurde bei 0°C in die wässrige Lösung der Aminosäuren eingeleitet, der ein Überschuß an $Ba(OH)_2$ zugesetzt war (siehe 6.1.) Die Ausbeuten der Produkte bewegten sich zwischen 70 und 80%. Sie könnten noch etwas gesteigert werden, wenn das Reaktionsgemisch nach beendeter Ethylenoxid-Einleitung noch vor Zugabe der H_2SO_4 einrotiert wird. Jedoch genügt in diesem Falle ein einmaliges Umfällen aus EtOH/EE nicht, um das Produkt analysenrein zu erhalten. Das Ausfällen aus alkoholischer Lösung geht i.a. problemlos vonstatten.

Die Hydroxyethylierung des freien Arg kann auch bei äquimolarer Zugabe von Ethylenoxid nicht auf der Stufe der N^{α}, N^{α}-Bis-(2-hydroxyethyl)-Verbindung angehalten werden. Wie die CHN-Analyse auswies, wird die Guanidinogruppe auch teilweise hydroxyethyliert, jedoch selbst bei einem Überschuß an Ethylenoxid nie vollständig. So zeigen sich in den Dünnschicht-Chromatogrammen, durch Verkohlung sichtbar gemacht, 3 bis 4 verschiedene Flecke, die sich mit SAKAGUCHI-Reagenz anfärben lassen, während mit Ninhydrin, außer bei äquimolarer Zugabe von Ethylenoxid, keine Färbung zu beobachten ist. Trotz der uneinheitlichen Reaktionsprodukte ließ sich das so hydroxyethylierte

Arg in fester Form ausfällen.

Um das definierte N^{α},N^{α}-Bis-(2-hydroxyethyl)-Arg mit freier Guanidinogruppe zu erhalten, mußte die Guanidino-Funktion also vor der Hydroxyethylierung selektiv geschützt werden. Hierfür boten sich zwei Möglichkeiten an: direkte Nitrierung oder Schutz mit zwei Z-Resten. In beiden Fällen lassen sich die Schutzgruppen durch katalytische Hydrierung an Pd/C wieder entfernen. Da die Darstellung von H_2N-Arg(NO_2)-OH wesentlich einfacher ist und größere Ausbeuten ergibt als die Synthese von H-Arg$(Z)_2$-OH, wurde ausschließlich Nitroarginin hydroxyethyliert.

Substitution der Hydroxylgruppen gegen Cl: Als Lösungsmittel bei der Chlorierungsreaktion wurde THF eingesetzt. Dieses ist wegen seines aprotischen Charakters inert gegenüber $SOCl_2$ und läßt sich nach beendeter Reaktion mittels Destillation wieder leicht entfernen. Das Thionylchlorid wurde in der 5- bis 10-fachen Menge zur eingesetzten N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-aminosäure zugegeben. Während der gesamten Reaktionszeit sollte die Temperatur -40°C nicht übersteigen. Das $SOCl_2$ darf nicht zu schnell zugetropft werden, da sonst das Reaktionsgemisch unter mächtigem Schäumen im Reaktionskühler aufsteigt, sich erwärmt und u.U. polymerisiert. Dies läßt sich an einer intensiven Braunfärbung erkennen.

Nach beendeter Reaktion muß das überschüssige $SOCl_2$ mit protischen Agenzien zerstört werden. Am besten eigenen sich hierfür H_2O oder Ameisensäure, weil hierbei ausschließlich gasförmige Reaktionsprodukte gebildet werden (100). H_2O bietet darüber hinaus den Vorteil, evtl. entstandene Säurechloride zu zersetzen (siehe 6.1.).

Um die bischlorethylierten Aminosäuren in kristalliner Form zu erhalten, muß das H_2O aus dem Reaktionsgemisch restlos entfernt werden. Hierzu wird unter Zugabe von Methylethylketon (Kp.: 79,6°C) mehrmals einrotiert. Dieses bildet mit H_2O ein Azeotrop mit einem Siedepunkt von 73,4°C bei 64,8 Gew.% H_2O. Anschließend sollte mit möglichst wasserfreien Lösungsmitteln (THF, Dioxan, MeOH, EE., Ether) weitergearbeitet werden.
Als entscheidender Schritt bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemischs erwies sich die Phasentrennung, die bei Zugabe von Dioxan zu den in THF gelösten Reaktionsprodukten auftrat. Die vollständige Auftrennung der beiden Phasen konnte dabei u.U. mehrere Tage dauern. Die gewünschte bischlorethylierte Aminosäure schied sich in der unteren Phase chromatographisch rein als zähflüssiges Öl ab. Es zeigte sich, daß die größten Ausbeuten bei einem Verhältnis von 1 Volumen THF zu 5-6 Volumen Dioxan erhalten wurden. Die obere Phase enthielt neben erheblichen Mengen an Verunreinigungen noch einen großen Teil der chlorethylierten Aminosäure, doch ließ sich dieser Anteil des Produkts auch nach erneutem Einrotieren, Aufnehmen in THF und Versetzen mit Dioxan nicht mehr als eigene Phase abtrennen.
Auf diese Weise konnten N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly und -Phe als Hydrochloride in fester, chromatographisch reiner Form mit Ausbeuten zwischen 45 und 55% zu den eingesetzten hyroxyethylierten Verbindungen erhalten werden. Teilweise ließen sie sich zur Kristallisation bringen. Die in 3.2.2. bzw. 3.2.4. angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die kristallisierten Produkte (13% für N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly und 21% für N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Phe). Die restlichen Ausbeuten fielen als amorphe Pulver an, deren Schmelzpunkte 2 - 3°C unter denen ihrer Kristalle lagen.

Im Falle des N^{α},N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-Arg ist das Produkt auch nach mehrmaligem Umfällen nur als zähflüssiges Öl angefallen, das ausgeprägtes hygroskopisches Verhalten zeigte.
Die Dipeptide N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly-Arg und -Phe-Arg konnten über direkte Kopplung von Bischlorethyl-Gly bzw. -Phe an Guanidino- und Carboxy-geschütztes Arg gewonnen werden. Als Guanidino-Schutz dienten bei der Kopplung an bischlorethyliertes Gly zwei Z-Reste, an Phe die Nitro-Gruppe. Als Carboxylkomponenten wurden dabei die kristallisierten Chargen eingesetzt. Die bischlorethylierten Dipeptide zeigten hohe Hygroskopizität und ließen sich nicht in fester Form, sondern lediglich als stabile Schäume erhalten, was sich teilweise ungünstig auf die CHN-Analysendaten auswirkte.
Die dargestellten chlorethylierten Verbindungen wurden durch Elementaranalyse, wenn möglich Schmelzpunkte und Dünnschichtchromatographie charakterisiert. Alle Verbindungen zeigten in den Laufmittelsystemen 1-4 chromatographisch einheitliches Verhalten und ließen sich mit NBP-Reagens charakteristisch blau färben. N^{α},N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-Arg und die beiden Dipeptide N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly-Arg und -Phe-Arg waren zusätzlich SAKAGUCHI-positiv, während mit Ninhydrin bei keiner der angegebenen Verbindungen eine Färbung auftrat.

5.2. Biologische Tests

5.2.1. Tests für ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen und Analoga

5.2.1.1. 1-^{14}C-Glucose-Oxydation in isolierten Fettzellen der Ratte

Als direktes Maß für die Bildung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose in Gegenwart der Guanidinoverbindungen dienen die pro Inkubationsansatz gemessenen cpm. Sie werden in Prozent angegeben und beziehen sich auf die basale $^{14}CO_2$-Produktion der Fettzellen in der jeweiligen Versuchsreihe, die gleich 100% gesetzt wird (= Kontrollwert). In jedem Inkubationsansatz betrug die applizierte Konzentration der entsprechenden Substanz jeweils 20 µM/ml.

Um die Schwankungen der Meßdaten von Versuchen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, rechnerisch ausgleichen zu können wurde die unterschiedliche maximale Stimulierbarkeit der Fettzellen durch Rinderinsulin an verschiedenen Versuchstagen (zwischen 720 und 1150% der Kontrolle) für jede Versuchsreihe anhand einer Eichkurve bestimmt.

In Tabelle 2 sind die Wirkungen aller drei Verbindungstypen auf die Glucose-Oxydation isolierter Fettzellen zusammengefaßt.

Wie ersichtlich vermindern 1-Guanidino-3-phenylpropan und 1-Guanidino-4-phenylbutan die Glucose-Oxydation erheblich (auf Werte von 43 bzw. 42%), während Insulin selbst in diesen Inkubationsansatz die Glucose-Oxydation auf 1087% stimuliert. Die Werte der restlichen Verbindungen wurden auf diese maximale Insulin-Stimulierung korrigiert.

Bei Betrachtung der Daten für die an Phenylalanindimethylamid

Tabelle 2 Bildung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose in isolierten Fettzellen des Nebenhodenfettkörpers der Ratte unter dem Einfluß von Guanidinoverbindungen

(die Substanzkonzentrationen betrugen jeweils 20 /u M/ 10^6 Fettzellen)

Verbindung	$^{14}CO_2$-Bildung in cpm/10^6 Fettzellen je ml in % der Kontrolle	Anzahl der Versuche
1-Guanidino-3-phenylpropan	43	5
1-Guanidino-4-phenylbutan	42	5
4-Guanidinobutyryl-phenylalanin-dimethylamid	94	6
5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid	92	6
6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid	88	4
11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid	87	4
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninamid	121	8
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanindimethylamid	112	8

gekoppelten ω-Guanidinocarbonsäuren sieht man, daß keine dieser Verbindungen die Schwankungsbreite von ± 10 % um den Kontrollwert deutlich überschreitet. Bei Werten zwischen 87 und 94 % lassen sich keine signifikanten Wirkungen zuordnen. Das gleiche gilt für das Tetrapeptid Arg-Gly-Phe-Phe-$N(CH_3)_2$. Zum Vergleich wurde das sequenzanaloge Tetrapeptid mit Carboxyl-endständiger freier Carbonamid-Gruppe gemessen (23). Beide Verbindungen verhielten sich bei Werten zwischen 121 und 112 % praktisch indifferent.

5.2.1.2. In-vivo-Messungen der U-^{14}C-Glucose-Aufnahme in Muskel, Fettgewebe und Blut der Maus

Als Maß für die biologischen Effekte der getesteten Verbindungen in Muskel und Fettgewebe dienten die cpm pro Gramm Gewebe. Die in Tabelle 3 und 4 zusammengefaßten Werte sind Prozentzahlen und beziehen sich auf den Leerwert, der gleich 100 % gesetzt ist. Dabei wird nicht differenziert, ob und in welcher Weise die markierte Glucose metabolisiert worden ist. Zum Vergleich werden die jeweils mit Insulin (2 µg / Maus) erreichten Werte der maximalen Stimulierung, ebenfalls in Prozent des Leerwerts, angegeben.

Die enzymatisch bestimmten Werte für den Blutglucose-Gehalt werden in Tabelle 5 direkt in mg pro 100 ml Blut angegeben. Als Leerwerte dienen hier die Blutzuckerkonzentrationen aus zwei verschiedenen Testreihen 120 min. nach Injektion von U-^{14}C-Glucose ohne vorherigen Zusatz von Guanidinoverbindungen.

Die verabreichten Dosen der Testsubstanzen lagen, entsprechend ihren Toxizitäten, zwischen 2,5 und 5 mg pro Maus (20-25 g).

Tabelle 3 In-vivo-Messung der ^{14}C-Aktivität im Diaphragma von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von Guanidinoverbindungen und 1-^{14}C-Glucose

Verbindung	Dosis (mg/Maus)	cpm/g Diaphragma in % des Leerwerts	Insulinwert (2 µg/Maus)	Anzahl der Versuche
1-Guanidino-3-phenylpropan	5	548	1565	6
1-Guanidino-4-phenylbutan	3	326	1565	6
4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid	5	158	1565	5
5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid	2,5	360	814	3
6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid	5	680	814	3
11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid	2,5	102	814	3
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninamid	5	757	1565	6
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanindimethylamid	5	398	814	4

Biologische Effekte im Muskelgewebe (Tabelle 3): Die drei Verbindungstypen zeigen mehr oder weniger ausgeprägte Aktivitäten. Im Falle von 1-Guanidino-3-phenylpropan ergibt sich, bei einer Dosis von 5 mg / Maus eine Stimulierung auf ca. 1/3 des Insulinwerts, im Falle von 1-Guanidino-4-phenylbutan (Dosis: 3 mg / Maus) auf etwa 1/5.

Von den vier ω-Guanidinocarbonsäure-Verbindungen ergaben 4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid und 11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid keine oder nur sehr geringe Stimulierung. Hingegen weisen 5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid mit 360 % (Dosis: 2,5 mg / Maus) und 6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid mit 680 % (Dosis: 5 mg / Maus) bei einem Insulinwert von 814 % signifikante Aktivitäten auf.

Die Tetrapeptide Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 und Arg-Gly-Phe-Phe-$N(CH_3)_2$ erreichen ungefähr die Hälfte der Insulinstimulierung.

Biologische Effekte im Fettgewebe (Tabelle 4): Die prozentuale Stimulierung der ^{14}C-Aktivitäten im epididymalen Fettgewebe unter dem Einfluß der Guanidinoverbindungen ist insgesamt zwar weniger ausgeprägt als im Muskelgewebe, doch zeigt sich in der Tendenz ein im wesentlichen kongruentes Verhalten. Lediglich für 5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid und 6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid sind die Wirkungen umgekehrt: erstere stimuliert mit 274 % bei einer Dosis von 2,5 mg / Maus stärker als letztere mit 242 % (Dosis: 5 mg / Maus). Der Abfall in den biologischen Aktivitäten vom 1-Guanidino-3-phenylpropan (181 %) zum 1-Guanidino-4-phenylbutan (159 %) ist von derselben Größenordnung wie im Muskelgewebe. Bei den Tetrapeptiden ist, bezogen auf die entsprechenden Werte der Insulinstimulierung, ein leichter Abfall vom Carboxyl-end-

Tabelle 4 In-vivo-Messung der ^{14}C-Aktivität im epididymalen Fettgewebe von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von Guanidinoverbindungen und ^{14}C-Glucose

Verbindung	Dosis (mg/Maus)	cpm/g Nebenhoden-fettgewebe in % des Leerwerts	Insulin-wert (2 µg/Maus)	Anzahl der Versuche
1-Guanidino-3-phenylpropan	5	181	647	6
1-Guanidino-4-phenylbutan	3	159	647	5
4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid	5	162	647	3
5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid	2,5	274	470	3
6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid	5	242	470	3
11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid	2,5	103	470	3
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninamid	5	209	647	6
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanindimethylamid	5	110	470	4

ständigen Amid zum Dimethylamid zu beobachten.

Biologische Effekte im Blut (Tabelle 5): Die Messungen der Glucose-Konzentrationen im Blut wurde in zwei Versuchsreihen durchgeführt, die mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf hypoglykämische Effekte ansprachen. In der ersten Versuchsreihe stieg die Glucose-Konzentration 120 min. nach der Injektion von U-^{14}C-Glucose durchschnittlich auf 96 mg pro 100 ml Blut und ließ sich durch gleichzeitige Applikation von 2 µg Insulin pro Maus auf 49,6 mg/100 ml senken, während in der zweiten Versuchsreihe bei einem Anstieg auf 72,5 mg Glucose pro 100 ml nach gleicher Insulingabe nur eine Senkung auf 53,7 mg/100 ml erreicht wurde.

Die Werte der drei Verbindungstypen zeigen untereinander verschiedene Effekte. So wird 120 min. nach Injektion von 5 mg pro Maus 1-Guanidino-3-phenylpropan der Blutglucosegehalt von 72,5 mg auf 31,5 mg/100 ml noch unter den entsprechenden Insulinwert (53,7 mg) gesenkt, während die Applikation von 3 mg 1-Guanidino-4-phenylbutan die Glucose-Konzentration im Blut auf 94,5 mg/100 ml erhöht.

Bei den an Phenylalanindimethylamid gekoppelten -Guanidinocarbonsäuren zeigen die beiden ersten Verbindungen praktisch keine Effekte während die 6-Guanidinohexanoyl- und 11-Guanidinoundecanoyl-Derivate schwache hypoglykämische Eigenschaften aufweisen. Gleiches gilt für das Dimethylamid des Tetrapeptids, während sich Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 indifferent verhält.

Zur Verdeutlichung der ausgeprägten hypoglykämischen Effekte des 1-Guanidino-3-phenylpropans wurde von dieser Verbindung und dem Strukturhomologen 1-Guanidino-4-phenylbutan zusätzlich die Blutgluco ekonzentration bei verschiedenen Zeitpunkten

Tabelle 5 Enzymatische Bestimmung des Blutglucosegehalts von Mäusen 120 Minuten nach intraperitonealer Injektion von Guanidinoverbindungen und Glucose

Verbindung	Dosis (mg/Maus)	Blutglucose-gehalt in mg/100 ml	Insulin-wert (2 µg/Maus)	Anzahl der Versuche
Leerwert	-	96	49,6	4
Leerwert	-	72,5	53,7	4
1-Guanidino-3-phenylpropan	5	51,3	53,7	3
1-Guanidino-4-phenylbutan	3	94,5	53,7	3
4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid	5	78,8	53,7	3
5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid	2,5	102,8	49,6	3
6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid	5	79,4	49,6	3
11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid	2,5	82,5	49,6	3
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninamid	5	77,6	53,7	3
L-Arginyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanindimethylamid	5	78,9	49,6	3

nach Injektion gemessen.

Dazu wurden weibliche Mäuse von 15 - 20 g Gewicht 24 Stunden nüchtern gesetzt. Pro Maus wurden 2 mg 1-Guanidino-3-phenylpropan und 1 mg 1-Guanidino-4-phenylbutan intraperitoneal injiziert. Für jede Zeiteinheit von 15, 30 und 60 min. wurden Gruppen zu drei Tieren gebildet und deren Blutglucose-Konzentration nach der GOD-Perid-Methode bestimmt. Die Werte der Kontrollgruppen (ohne Zugabe von Guanidino-Verbindungen) wurden nach jeweils 30 min. gemessen. In Tabelle 6 sind die Meßwerte zusammengefaßt, wobei die angegebenen Daten aus den Mittelwerten von drei Messungen gebildet wurden.

Tabelle 6 Blutzuckerbestimmung von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von

A: 2 mg 1-Guanidino-3-phenylpropan

B: 1 mg 1-Guanidino-4-phenylbutan

Zeit in min.		15	30	60	Kontrolle (30)
Blutglucose in mg/100 ml	A	39	30	38	49
	B	62	64	65	58

Normalerweise beträgt der Nüchternblutzuckerwert bei Mäusen 55 - 65 mg / 100 ml. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich zeigt auch hier nur 1-Guanidino-3-phenylpropan deutliche hypoglykämische Eigenschaften. Maximale Blutglucose-Senkung von 49 mg auf 30 mg / 100 ml wird nach 30 min. erreicht. Im Falle von 1-Guanidino-4-phenylbutan hat sich der Blutzuckerspiegel über den gesamten Meßzeitraum nur unwesentlich nach höheren Werten verändert.

5.2.2. Test für chlorethylierte Verbindungen

Um die einzelnen alkylierenden Verbindungen in ihrer cytostatischen Wirkung miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig

a) die Einbauraten der radioaktiv markierten Metabolite bei gleicher Konzentration der eingesetzten Verbindungen zu messen

b) die Konzentrationen so zu wählen, daß sich auch unterschiedliche Effekte signifikant über den ganzen Meßzeitraum von 120 min. nachweisen lassen.

Als direktes Maß für die Hemmwirkung der eingesetzten Verbindungen dienten dabei die pro Inkubationsansatz gemessenen cpm. Die Prozentwerte beziehen sich auf die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen cpm des Kontrollansatzes (ohne Zusatz cytostatischer Verbindungen), die gleich 100 % gesetzt sind.

Zunächst wurden die Einbauraten bei Zusatz von N,N-bis-chlorethyl-Gly und -Phe im Konzentrationsbereich von 5×10^{-5} M bis 10^{-2} M bei 6 verschiedenen Konzentrationen (5×10^{-5} M; 10^{-4} M; 5×10^{-4} M; 10^{-3} M; 5×10^{-3} M und 10^{-2} M) gemessen. Es zeigte sich, daß die zu wählende Konzentration zwischen 10^{-4} M und 10^{-3} M zu suchen war.

Abb.4 zeigt die Einwirkung von N,N-bis-chlorethyl-Gly auf den Einbau von Thymidin (Thd), Uridin (Urd) und Leucin (Leu) im Verlauf der zweistündigen Inkubation in den Konzentrationen 10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 7×10^{-4} M und 10^{-3} M. Daraus geht hervor, daß der auftretende Hemmeffekt dosisabhängig ist. Der gleiche Effekt ist bei Zusatz von N,N-bis-chlorethyl-Phe in den ge-

nannten Konzentrationen zu beobachten (Abb.5). Bei der Konzentration 10^{-4} M werden die Einbauraten der drei Metabolite auf ca 80 % gesenkt, während sie bei 10^{-3} M bereits nach 60 min. auf Werte deutlich unter 50 % abfallen. In Abb. 6 und 7 sind die Abhängigkeiten der Hemmung von den Konzentrationen der eingesetzten bischlorethylierten Aminosäuren Gly bzw. Phe im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-3} M dargestellt.

Für vergleichende Messungen wurden nun die alkylierenden Verbindungen in den Konzentrationen 5×10^{-4} eingesetzt. Bei dieser Konzentration sinken die Einbauraten bei Zusatz von N,N-Bis-chlorethyl-Gly und -Phe nach 120 min. auf Werte um 50 % (Abb. 8 und 9). Evtl. Unterschiede in den Hemmeffekten der eingesetzten Verbindungen wären bei dieser Konzentration aus den Einbaukurven am deutlichsten zu ersehen.

Die Frage, inwieweit die alkylierenden Eigenschaften der Chlorethylgruppen für die Einbauhemmung von Thd, Urd und Leu verantwortlich sind, wurde im Falle von N,N-Bischlorethyl-Gly und -Phe durch Testen der analogen hydroxyethylierten Verbindungen untersucht. Abb. 1 und 2 zeigen die Einbaukurven von N,N-Bis-hydroxyethyl-Gly und -Phe. Es wurde zusätzlich bei zwei verschiedenen Konzentrationen gemessen (10^{-4} und 5×10^{-4} M), um auch hier evtl. Dosisabhängigkeiten zu erfassen. Wie ersichtlich, sind bei den hydroxyethylierten Verbindungen bei den angegebenen Konzentrationen keinerlei Hemmeffekte festzustellen. Bei Vergleich der Abb. 1b mit Abb. 8, bzw. Abb. 2b mit Abb. 9 läßt sich somit erkennen, daß die Hemmwirkung eindeutig den Chlorethyl-Gruppen zugeschrieben werden kann. Um zu zeigen, in welchem Ausmaß die Anzahl der Chlorethylgruppen pro Molekül zur Hemmwirkung beitragen, wurde

neben den bifunktionellen Bis-chlorethyl-Aminosäuren auch das einfach chlorethylierte N-Chlorethyl-N,N-dimethylammoniumchlorid bei Konzentrationen von 10^{-4} und 5×10^{-4} M getestet. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, sind Hemmeffekte auch hier nachweisbar, aber in geringerem Maße als bei den bischlorethylierten Verbindungen.

Vergleicht man die Einbaukurven der bischlorethylierten Aminosäuren Gly und Phe miteinander (Abb. 8 und 9), so läßt sich feststellen, daß keine wesentlichen Unterschiede im Hinblick auf das Hemmverhalten auftreten. Die Einbauraten von Thd, Urd und Leu sinken etwa in gleichem Maße auf Werte zwischen 45 % und 75 % ab, wobei der Leu-Einbau am stärksten inhibiert wird, gefolgt vo Thd und Urd.

Die Hemmeffekte des bischlorethylierten Arg (Abb. 10) sind besonders beim 30-min.-Wert wesentlich deutlicher ausgeprägt als dies bei Gly und Phe der Fall ist. Zwischen 60 und 120 min. sind sie nur geringfügig zu niederen Prozentwerten verschoben.

Im Gegensatz dazu verhalten sich die Einbaukurven bei Zusatz der bischlorethylierten Dipeptide Gly-Arg (Abb. 11) und Phe-Arg (Abb. 12). Bis zum 60-min.-Wert liegen sie deutlich über den entsprechenden Werten der chlorethylierten Aminosäuren; erst nach 90 min. fallen sie in den für die anderen Verbindungen gemessenen Bereich von 50 - 60 % ab.

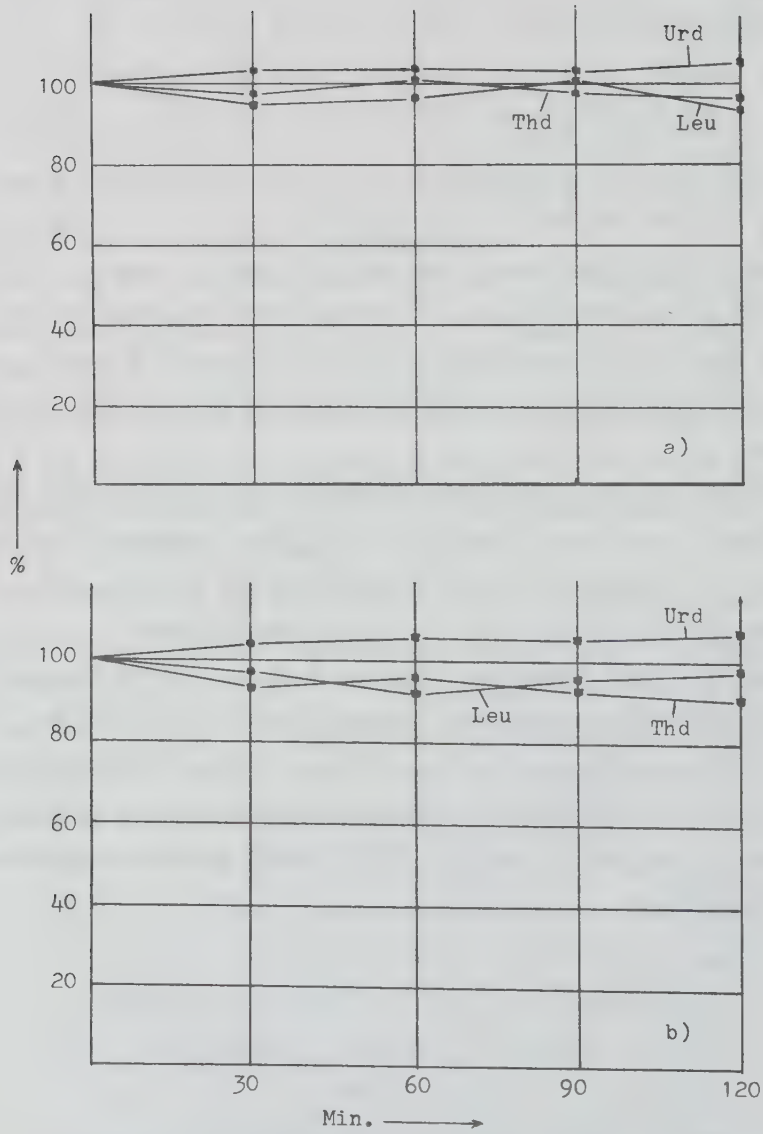


Abb. 1 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-hydroxyethyl-Gly

(a: 10^{-4} M; b: 5×10^{-4}M)

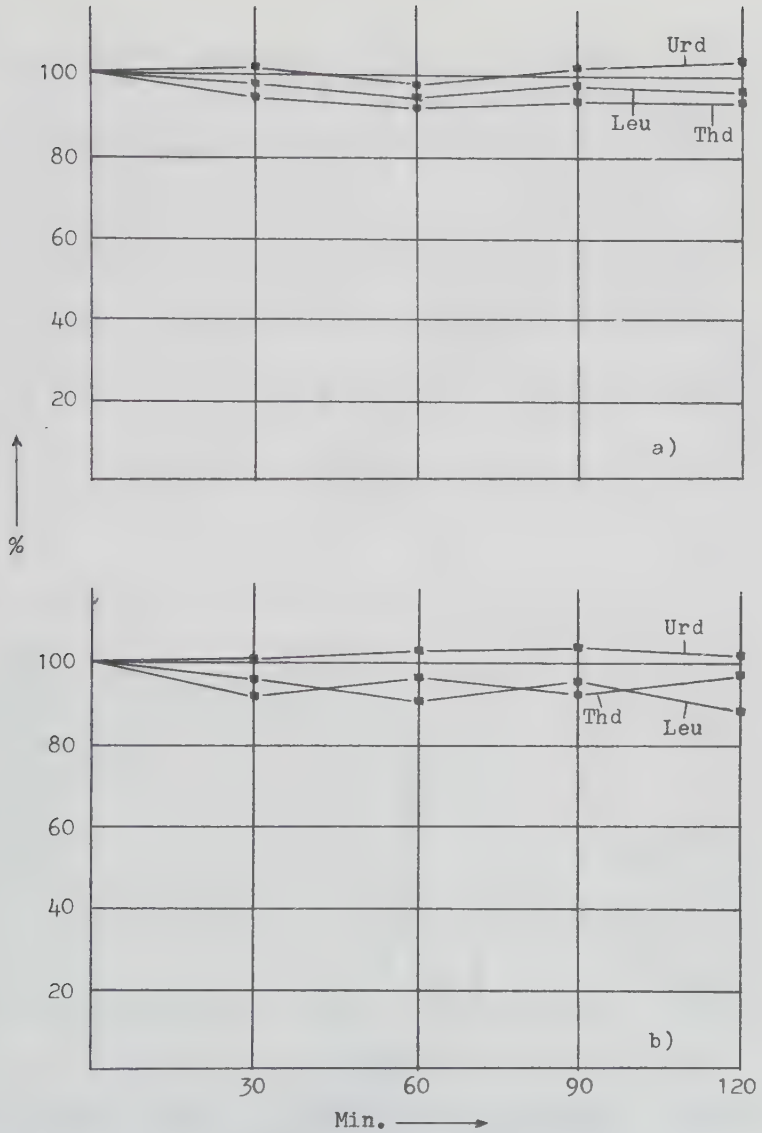


Abb. 2 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-hydroxyethyl-Phe

(a: 10^{-4} M; b: 5×10^{-4} M)

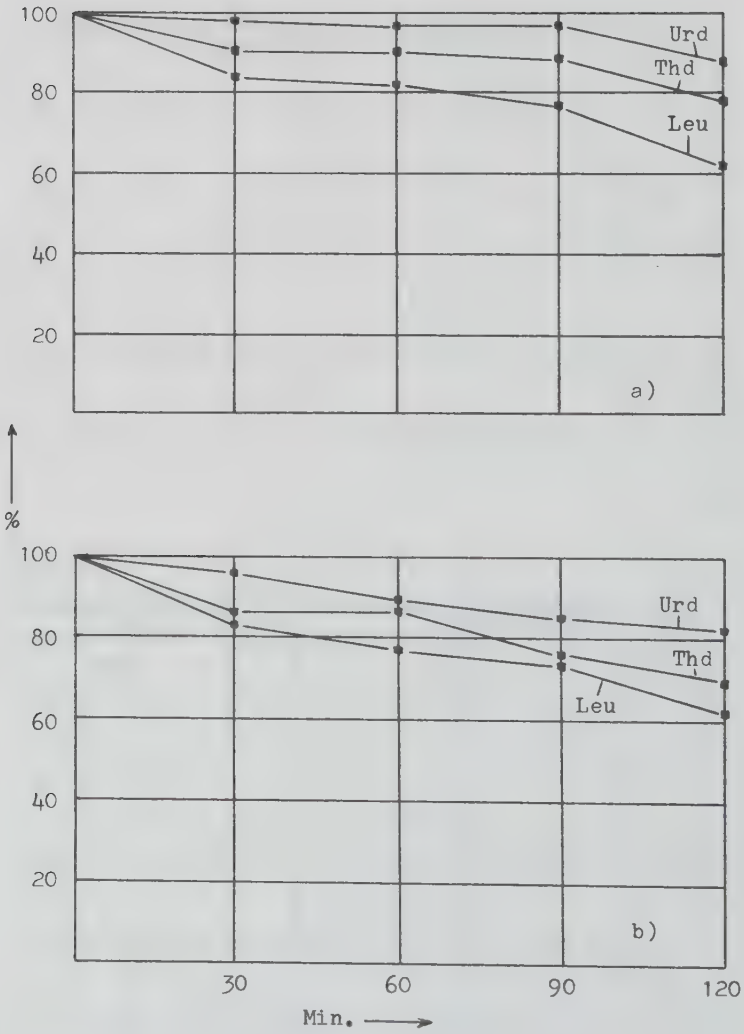


Abb. 3 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Chlorethyl-dimethyl-ammoniumchlorid

(a: 10^{-4} M ; b: 5×10^{-4} M)

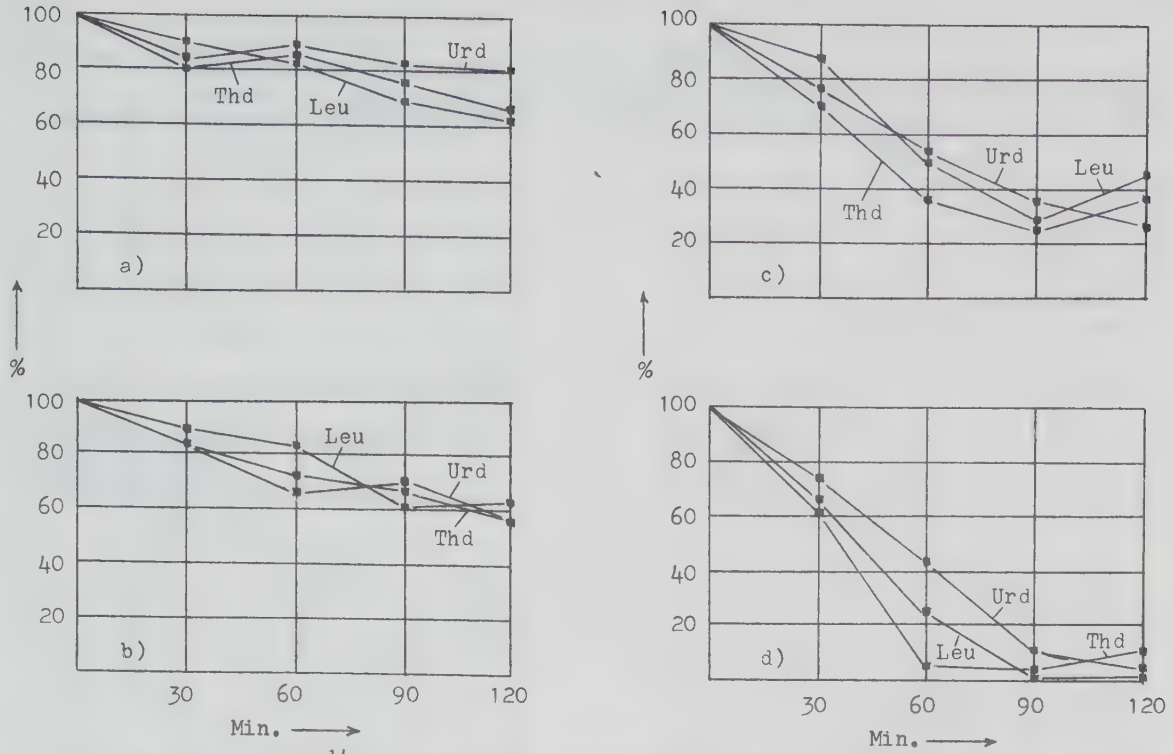


Abb.4 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-chlorethyl-Gly.
(a: 10^{-4} M; b: 3×10^{-4} M; c: 7×10^{-4} M; d: 10^{-3} M)

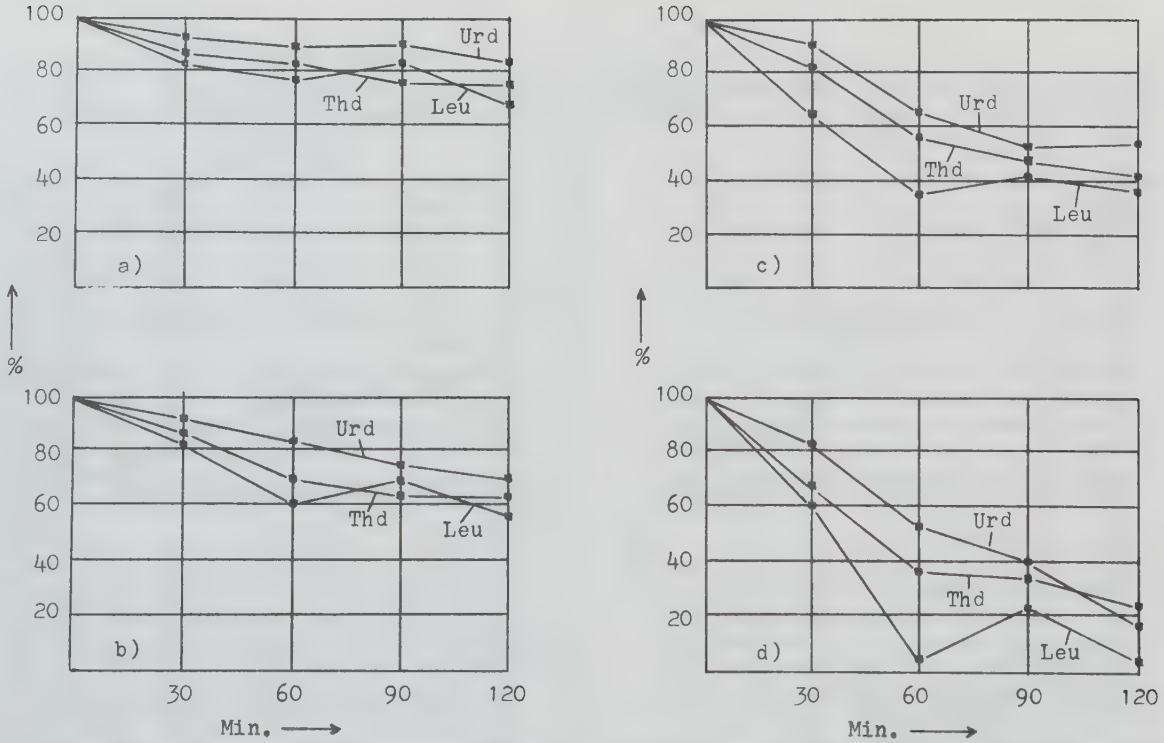


Abb. 5 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-chlorethyl-Phe. (a: 10^{-4} M; b: 3×10^{-4} M; c: 7×10^{-4} M; d: 10^{-3} M)

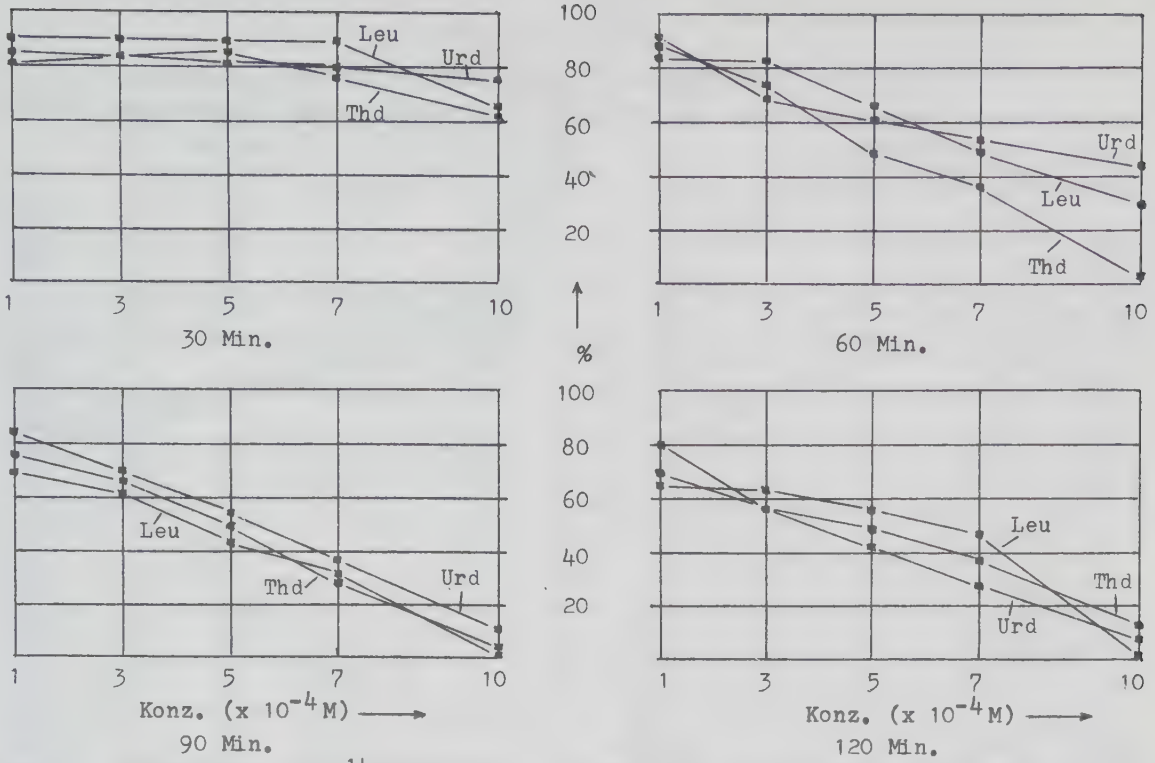


Abb. 6 Abhängigkeit der ^{14}C-Thymidin-, -Uridin- und -Leucin-Einbauraten von der Konzentration an Bis-chlorethyl-Gly im Bereich von 10^{-4} M bis 10^{-3} M (Kontrolle = 100 %)

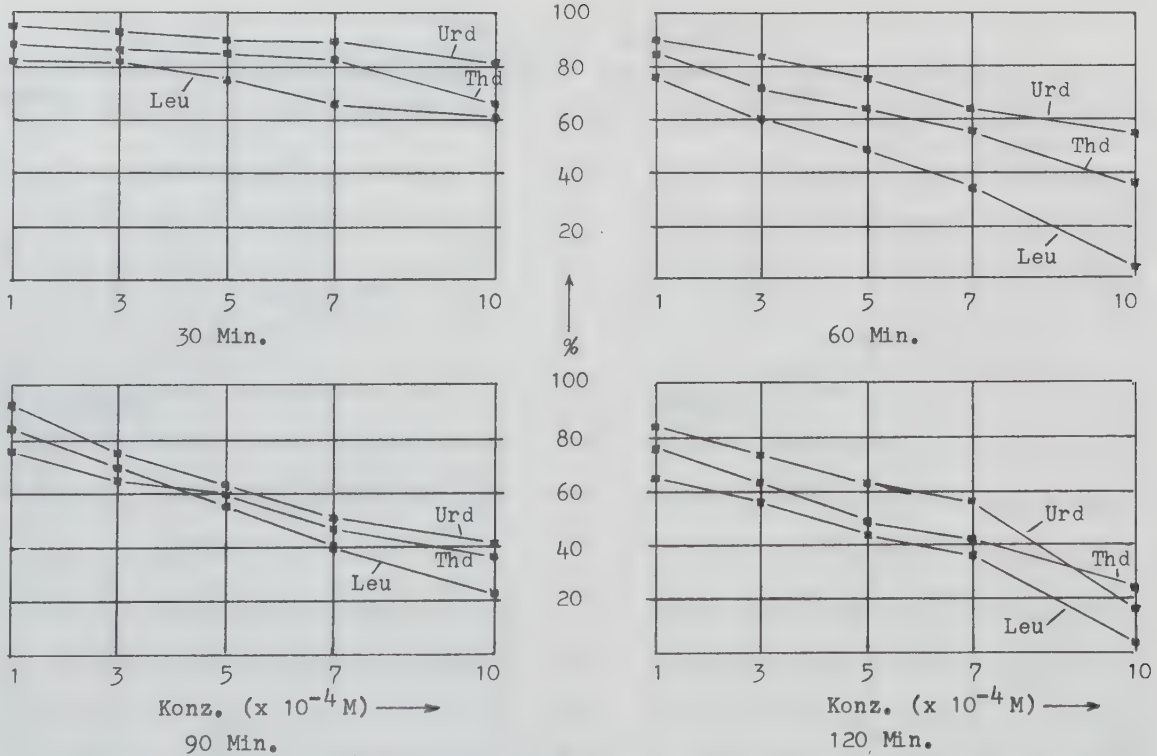


Abb. 7 Abhängigkeit der ^{14}C-Thymidin-, -Uridin- und -Leucin-Einbauraten von der Konzentration an Bis-chlorethyl-Phe im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-3} M.

(Kontrolle = 100 %)

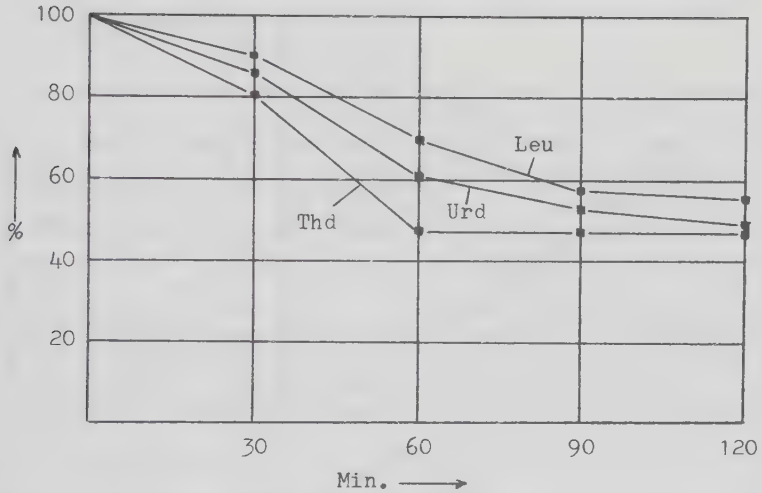


Abb.8 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-chlorethyl-Gly. (Konz.: 5×10^{-4} M)

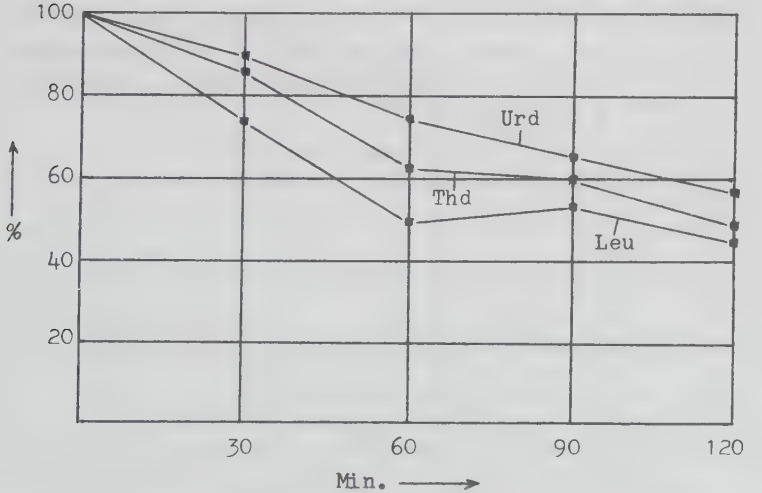


Abb.9 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-chlorethyl-Phe. (Konz.: 5×10^{-4} M)

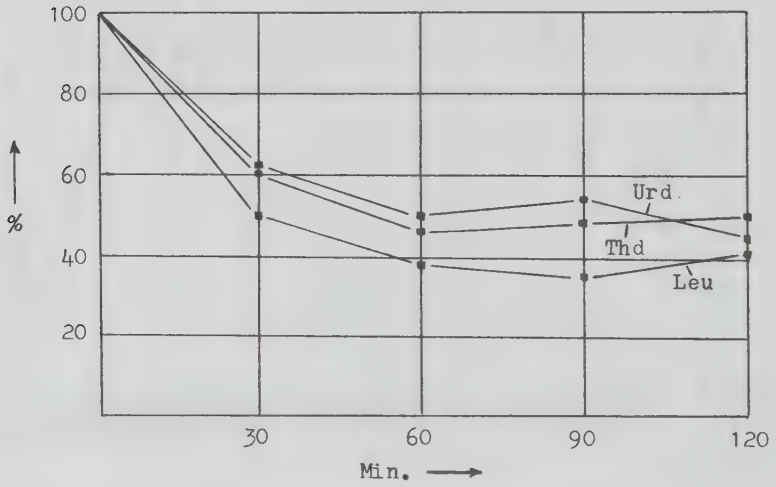


Abb. 10 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen in Gegenwart von Bis-chlorethyl-Arg (Kontrolle = 100 %)

(Konz.: 5×10^{-4} M)

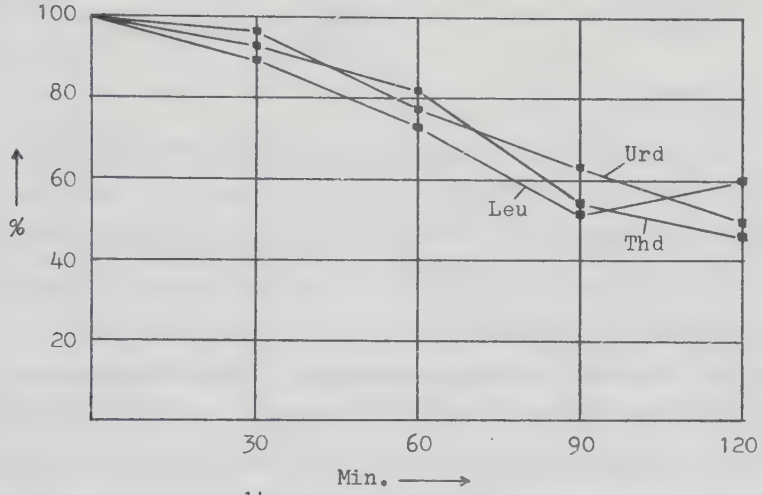


Abb. 10 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-chlorethyl-Gly-Arg. (Konz.: 5×10^{-4} M)

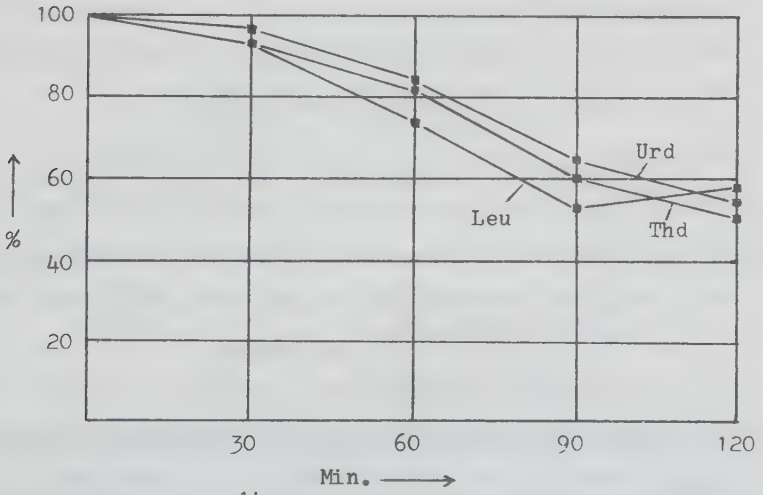


Abb. 11 Einbau von ^{14}C-Thymidin (Thd), -Uridin (Urd) und -Leucin (Leu) in Ascites-Zellsuspensionen (Kontrolle = 100 %) in Gegenwart von Bis-chlorethyl-Phe-Arg. (Konz.: 5×10^{-4} M)

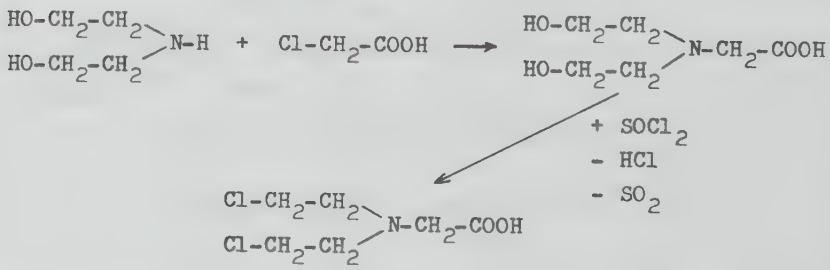
6. DISKUSSION

6.1. Synthesen

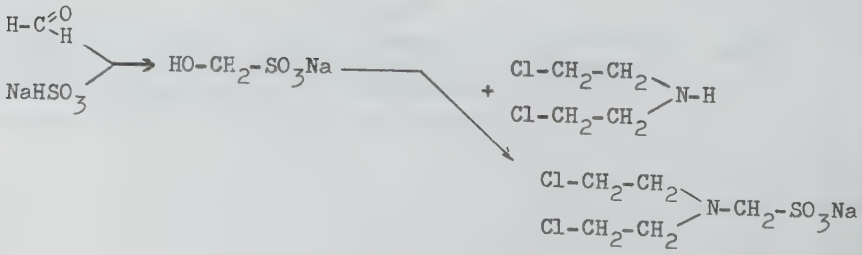
Für die Synthese der ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen und ihrer Analoga konnte bei den einzelnen Reaktionsschritten auf bewährte Methoden der Peptidchemie zurückgegriffen werden. Es stellte sich lediglich die Frage nach der besten Strategie in der Abfolge der Teilstufen.

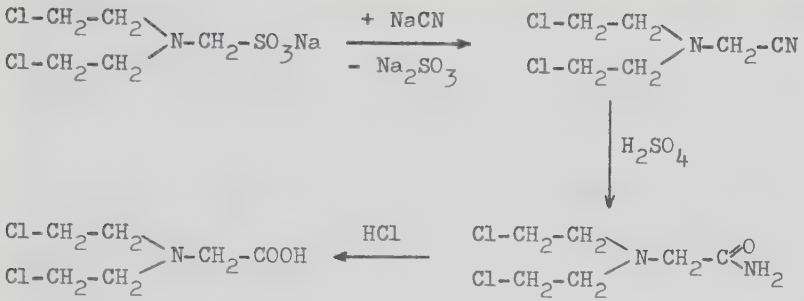
Bei der Synthese der chlorethylierten Verbindungen mußte erst eine gangbare Methode entwickelt werden. In der Literatur sind bisher die Synthesen von drei bischlorethylierten Aminosäuren beschrieben worden: N,N-(2-chlorethyl)-Gly, -Ala und -Taurin. Im Falle des Gly erfolgte die Synthese nach zwei verschiedenen Methoden:

1) Ausgehend von Monochloressigsäure und Diethanolamin (37) über das N,N-(2-hydroxyethyl)-Gly. Dieses wird mit Thionylchlorid in das bischlorethylierte Gly umgesetzt:

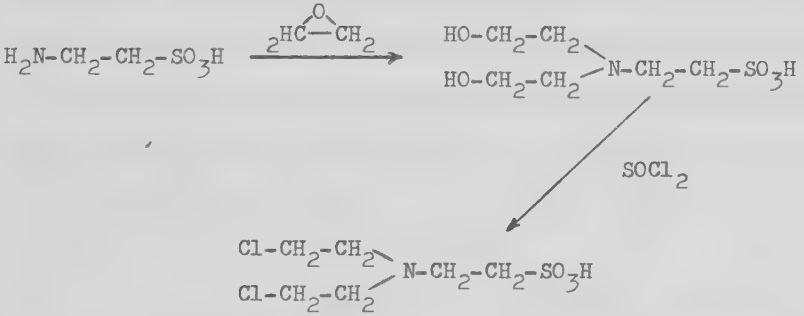


2) Aus Formaldehyd, $NaHSO_3$ und N-Norlost nach KNOEVENAGEL (37,101):





Bischlorethyliertes Ala wurde nach 2), ausgehend von Acetaldehyd, synthetisiert (37), während die Synthese des N,N-(2-chlorethyl)-Taurins über Hydroxyethylierung von Taurin mit Ethylenoxid und anschließende Chlorierung mit $SOCl_2$ erfolgte (37):

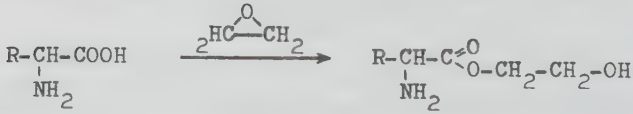


Wegen der teilweise schwierigen Zugänglichkeit der entsprechenden Aldehyde bzw. Halogencarbonsäuren, besonders für den Fall des Arg-Derivats, wurde in der vorliegenden Arbeit von den freien Aminosäuren ausgegangen. Dabei wurde die Vorschrift zur Synthese von N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Taurin in stark modifizierter Form angewandt. Diese Variante könnte eine für die meisten Aminosäuren anwendbare Methode zur Überführung in ihre bischlorethylierten Derivate darstellen, sofern bei mehrfunktionellen Aminosäuren die zusätzlichen reaktiven Gruppen geschützt sind. Im Falle des Arg war für die Guanidino-Funktion eine Schutzgruppe einzuführen, die zum einen stabil gegenüber Ethy-

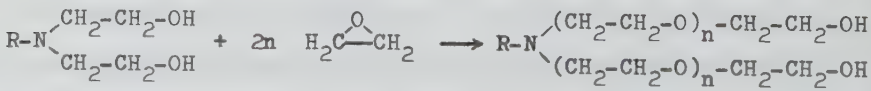
lenoxid sein mußte, zum andern von den resultierenden Chlorethyl-Gruppen nicht alkylierend angegriffen werden durfte. Sowohl die Nitrogruppe als auch zwei Z-Reste erwiesen sich als geeignet.

Bei der Hydroxyethylierung einer Aminosäure handelt es sich formal um die Anlagerung eines primären Amins an Ethylenoxid (102). Eine solche Reaktion wird in wässrigem Medium im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln erheblich beschleunigt. Da die α-Aminogruppen der in wässriger Lösung amphoteren Aminosäuren einer Hydroxyethylierung mit Ethylenoxid nur in ungeladenem Zustand leicht zugänglich sind, sollte die Reaktion im alkalischen Milieu erfolgen. Unter diesen Bedingungen können bei Aminosäuren jedoch zwei Nebenreaktionen auftreten:

1) Nach Untersuchungen von FRAENKEL-CONRAT an Peptiden (103) setzen sich Epoxide mit Carboxylgruppen leicht zu Estern um, vorzugsweise dann, wenn diese in dissoziierter Form vorliegen:



2) Bei Einwirkung von Ethylenoxid auf bereits gebildete Hydroxyethylgruppen können diese zu Hydroxyethylethern weiterreagieren (104):



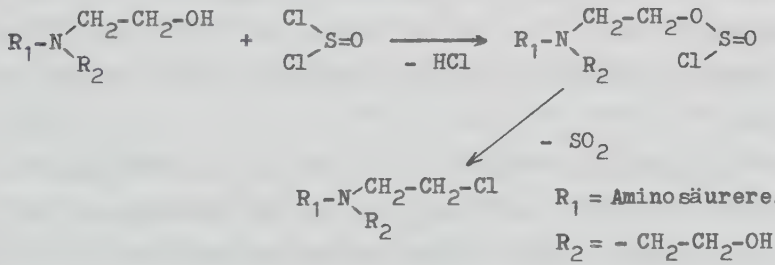
Zur Vermeidung der Esterbildung können Aminosäuremethylester eingesetzt werden und in wässriger Suspension in Gegenwart von TÄA hydroxyethyliert werden. Durch zusätzliches Einleiten von

CO_2 läßt sich die Bildung von Hydroxyethylethern unterbinden (105).

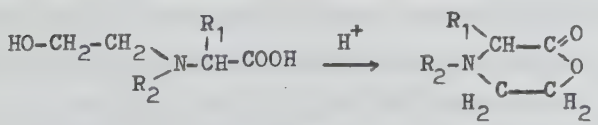
Der Umweg über die Methylester kann aber unterbleiben, wenn Ethylenoxid bei 0°C in die wässrige Aminosäurelösung eingeleitet wird, der ein Überschuß an $Ba(OH)_2$ zugesetzt ist. Veresterung findet hierbei, anders als bei Zusatz von NaOH, nicht statt. Ebenso unterbleibt die Bildung von Hydroxyethylethern. Nach Einrotieren und Trocknen des Reaktionsansatzes lassen sich die hydroxyethylierten Aminosäuren direkt als Ba-Salze in die anschließende Chlorierungsreaktion einsetzen.

Bei der Umsetzung von N^{α},N^{α}-Bis-(2-hydroxyethyl)-aminosäuren mit Thionylchlorid können neben der gewünschten Substitution der OH-Gruppen durch Cl zwei weitere Nebenreaktionen auftreten:

1) Thionylchlorid reagiert mit den Hydroxyethyl-Gruppen unter Esterbildung als Zwischenstufe (100):



Unter dem Einfluß der anfallenden HCl können sich aus noch nicht umgesetzten N-hydroxyethyl-aminosäuren, besonders beim Erwärmen, leicht Morpholone bilden (106):



R_1 = Aminosäurerest

R_2 = $-CH_2-CH_2-OH$ oder $-CH_2-CH_2-Cl$

Diese Reaktion läßt sich vermeiden, wenn das gebildete HCl durch Zugabe eines Überschusses an Pyridin abgefangen wird.

2) Die freien Carboxylgruppen können in Säurechloride überführt werden (107). Diese würden schon bei Raumtemperatur unter den gegebenen Reaktionsbedingungen sofort mit den noch unsubstituierten Hydroxyethyl-Gruppen zu Estern weiterreagieren und so letztlich zu einer Polymerisation führen. Die von IZUMI (37) angegebene Variante der Darstellung von N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly aus N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-Gly und $SOCl_2$ unter Rückfluß bei 80°C findet unter idealen Polymerisationsbedingungen statt!

Zur Vermeidung dieser Reaktion wird bei Temperaturen zwischen -50 und -60°C gearbeitet, da hierbei die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von Säurechloriden mit primären Hydroxylgruppen zu Estern im Vergleich zur Reaktion von Hydroxylgruppen mit $SOCl_2$ gering ist. Evtl. gebildete Säurechloride werden nach beendeter Reaktion bei der Zerstörung des im Überschuß zugesetzten Thionylchlorids mit H_2O wieder in Carboxylgruppen überführt.

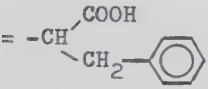
Wie in 2.4.2. angeführt, kann bei der Synthese der bischlorethylierten Dipeptide Gly-Arg und Phe-Arg die Knüpfung der Peptidbindung vor und nach Einführung der Chlorethylgruppen erfolgen. Erfolgt zunächst der Aufbau des Dipeptids, wobei für die Kopplung alle unter 2.4.1. genannten Methoden zur Anwendung kommen können, dann lassen sich die Chlorethylgruppen nach selektiver Abspaltung der Amino-Schutzgruppe über Hydroxyethylierung mit Ethylenoxid und anschließende Chlorierung mit Thionylchlorid einführen.

Wird jedoch als N-geschützte Aminosäurekomponente eine N,N-

Bis-(2-chlorethyl)-aminosäure eingesetzt, so wird die Variationsbreite an Kopplungsmethoden eingeschränkt. Die alkylierenden Eigenschaften der Chlorethyl-Gruppen beruhen nämlich auf der Ausbildung eines Aziridin-Ringsystems als Zwischenstufe, dessen Ethylenimonium-Ion seinerseits einem nucleophilen Angriff von Aminkomponenten mit freiem Elektronenpaar unterliegen kann (108):

$R_1 = -CH_2-CH_2-Cl$

$R_2 = -CH_2-COOH$ für N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly

 für N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Phe

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei der Aufbau des Aziridin-Rings, der bevorzugt in wässrigem Milieu erfolgt. Eine Carboxy-Aktivierung nach der Azid- oder der Carbodiimid-Methode kommt wegen der ausgeprägten nucleophilen Zentren in Hydrazin bzw. den intermediären O-Acyl-isoharnstoff-Derivaten nicht in Frage. Da die aktivierten Ester aus N-geschützter Aminosäure und dem entsprechenden Alkohol vorzugsweise auch mit Carbodiimid synthetisiert werden, entfällt auch diese Variante. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Methode der gemischten Anhydride unter Verwendung von Chlorameisensäureisobutylester angewandt (50). Bei dieser Kopplungsmethode kann größtenteils unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet werden, um zu vermeiden, daß die freie Aminogruppe des Arg selbst von den Chlorethylgruppen nach Bildung eines Ethylenimonium-Ions alkyliert wird.

6.2. Biologische Tests

ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen und Analoga

Von den arginylfreien Guanidinoverbindungen weisen die beiden monosubstituierten Guanidine 1-Guanidino-3-phenylpropan und 1-Guanidino-4-phenylbutan ausnamslos in allen Testsystemen signifikante Aktivitäten auf. Sie senken gleichermaßen deutlich die CO_2-Produktion in isolierten Fettzellen, entsprechend einer Hemmung des Pentose-Phosphat-Zyklus. Wie bei arginylfreien Guanidinoverbindungen zu erwarten, zeigen sie ein der Insulinwirkung entgegengesetztes Verhalten.

Bei der Glucose-Aufnahme in Muskel und Fettgewebe läßt sich schon anhand der Insulinstimulierung sehen, daß erstere weit empfindlicher anspricht. Die Wirkungsrichtung der Aktivitäten stimmt mit der des Insulins überein, wobei in beiden Fällen ein Abfall in Richtung zum kettenlängeren Homologen zu beobachten ist.

Noch deutlicher zeigt sich dieser Effekt bei der Senkung des Blutzuckerspiegels. Während beim 1-Guanidino-3-phenylpropan die Glucose-Konzentration bis unter die mit Insulin erreichten Werte abfällt, tritt bei dem Homologen mit nur einer zusätzlichen Methylengruppe keinerlei hypoglykämische Aktivität mehr auf (Tabelle 6).

Wird also bei monoalkylierten Guanidinen in ω-Stellung zur Guanidino-Gruppe ein Phenyl- bzw. Benzylrest eingeführt, so hat der aromatische Rest eine Verstärkung der Aktivität zur Folge, analog dem Verhalten bei Einführung einer geschlossenen Carboxylgruppe (10). Da es sich dabei um eine apolare Gruppierung handelt, die weder über elektrostatische Wechselwirkungen

noch über Wasserstoffbrücken mit geladenen Gruppen interagieren kann, läßt sich daraus schließen, daß in solchen Verbindungen die Guanidino-Gruppe aufgrund ihres kationischen Charakters die bekannte Funktion als Kationenerkennungs- und Bindungsort ausübt, der Phenylrest aber über hydrophobe Wechselwirkungen als zusätzliche Orientierungshilfe dient. Der Abstand von aromatischem Ring und Guanidino-Gruppe ist dabei von entscheidender Bedeutung. Die kritische Distanz liegt bei vier Methylengruppen zwischen Guanidino-Funktion und Phenylrest.

Die an Phe-dimethylamid gekoppelten ω-Guanidinocarbonsäuren zeigen bei der Glucose-Oxydation in isolierten Fettzellen nur in der Tendenz erwartungsgemäß ein dem Insulin entgegengesetztes Verhalten. Die Werte überschreiten kaum die Signifikanzgrenze von ± 10 %. Das wäre eine Bestätigung für die Theorie, daß für die ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen eine nichtunterbrochene Methylenkette essentiell für deren Aktivitäten sind. Ähnlich niedere Effekte zeigen sich auch im Hinblick auf die hypoglykämischen Eigenschaften (10).

Bei der Glucose-Aufnahme in Muskel und Fettgewebe stehen die Ergebnisse jedoch im Widerspruch zu der genannten Theorie: Im Falle der ^{14}C-Aufnahme in den Muskel zeigt sich ein deutlicher Aktivitätsanstieg vom 4-Guanidinobutyryl- zum 6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid und fällt beim 11-Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid wieder auf Nullaktivität ab. Analoges Verhalten zeigt sich auch bei der ^{14}C-Aufnahme in Fettzellen.

Ein Vergleich der Kettenlängen der aktiven Verbindungen 5-Guanidinovaleryl-Phe-$N(CH_3)_2$ (7 C, 1 N) und 6-Guanidinohexanoyl-Phe-$N(CH_3)_2$ (8 C, 1 N) mit den von WEITZEL und Mitarbeitern ge-

messenen aktiven ω-Guanidinocarbonsäuredimethylamiden (10) zeigt, daß sie gerade in dem dort gefundenen "kritischen" Bereich von C_8 - C_{12} angesiedelt sind. Das inaktive Homologe 11-Guanidinoundecanoyl-Phe-$N(CH_3)_2$ entspricht in seiner Kettenlänge gerade dem Tetrapeptid Arg-Gly-Phe-Phe-$N(CH_3)_2$.

Diese Verbindung zeigte bei der Glucose-Oxydation in isolierten Fettzellen, gemessen an der hohen Stimulierbarkeit durch Insulin selbst (über 1000 %) keine Effekte. Ebenso ließen sich bei den Vergleichsmessungen des Tetrapeptids mit carboxyendständiger Carbonamid-Gruppe die in früheren Veröffentlichungen von WEITZEL u.a. erreichten Werte (23) einer Stimulierung des Pentosephosphat-Zyklus nicht reproduzieren. Ähnlich indifferent war das Verhalten der beiden Tetrapeptide bei der Blutglucose-Bestimmung.

Deutliche Effekte ließen sich hingegen bei der ^{14}C-Aufnahme in Muskel und Fettgewebe nachweisen.

Nach neueren Untersuchungen von KIKUCHI und Mitarbeitern zeigen die verschiedenen Oligopeptide mit Partialsequenzen von Position 22 bis 26 der Insulin-B-Kette an sich keinerlei Aktivitäten in Fettzellen. Nur in Gegenwart suboptimaler Konzentrationen an Insulin selbst ließen sich Effekte nachweisen, indem sie die Bindung des Insulins an seinen Rezeptor verstärken. Für eine solche Insulinstimulierung ist jedoch das Vorhandensein einer Guanidino-Gruppe in Position B22 essentiell (109-111).

Chlorethylierte Verbindungen

Die Untersuchungen auf cytostatisches Verhalten der chlorethylierten Verbindungen wurden an Zellen des EHRLICH-Ascites-Carcinoms durchgeführt. Ausgehend von der von WEITZEL und Mitarbeitern entwickelten Methode (80) wurde der Test in zwei wichtigen Punkten modifiziert:

1) Die Aszites-Zellen wurden bereits drei Tage nach ihrer Injektion in die Bauchhöhle der Mäuse entnommen (Weitzel: 10 Tage). Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen noch genügend stabil um selektiv auf cytotoxische Effekte zu reagieren. Nach 10 Tagen zeigen auch nichttoxische Substanzen ausgeprägte Wirkungen auf das Testsystem.

2) Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem mit HEPES gepufferten Vollmedium (Tabelle 1), um ihre Empfindlichkeit gegenüber cytotoxischen Substanzen über die gesamte Meßdauer konstant zu halten.

Als entscheidendes Kriterium für die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse erwies sich die möglichst homogene Durchmischung der Ascites-Flüssigkeit während des gesamten Meßzeitraums. Es zeigte sich, daß dies dann der Fall war, wenn die Kontrollwerte vom 30- zum 120-min.-Wert konstant um ca. 20 % abfielen.

Die Testergebnisse sind in Abb.:13 zusammengefaßt. Bei dieser Darstellung läßt sich erkennen, daß das bischlorethylierte Arg bis zum 60-min.-Wert die übrigen Werte deutlich übertrifft, während sich nach 120 min. alle Hemmwerte auf gleichem Niveau einpendeln. Umgekehrt hinken die Hemmeffekte der bischlorethylierten Dipeptide Gly-Arg und Phe-Arg den ent-

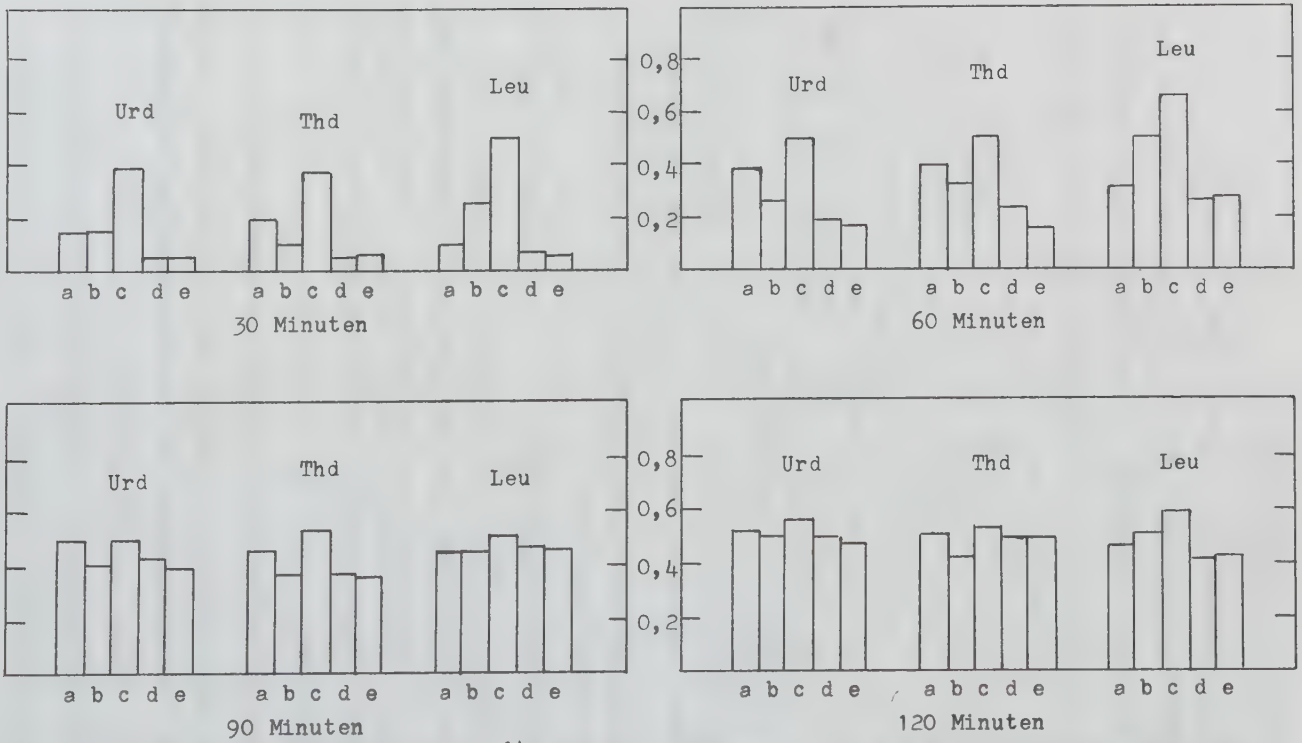


Abb. 13 Hemmung der Einbauraten von ^{14}C-Uridin, -Thymidin und -Leucin in Ascites-Zellsuspensionen in Gegenwart der Verbindungen a bis e in Bruchteilen totaler Hemmung (=1) (Kontrolle = 0)

a = N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly
b = N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Phe
c = N^{α},N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-Arg
d = N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Gly-Arg
e = N,N-Bis-(2-chlorethyl)-Phe-Arg

sprechenden Werten von Gly und Phe hinterher und erreichen diese erst ca. 30 min. später. Daraus geht hervor, daß die alkylierenden Aktivitäten aller 5 Verbindungen gleich sind, während die jeweiligen cytotoxischen Effekte zu verschiedenen Zeitpunkten variieren.

Wie in 6.1. bereits angeführt, üben Verbindungen mit der Nor-N-Lost-Gruppierung ihre alkylierende Wirkung über ein Aziridin-Ringsystem als Zwischenstufe aus. Das elektrophile Ethylen-Immonium-Ion kann nun eine Vielzahl von biologischem Material, wie Nukleinsäuren, Proteine und Nukleotide, unspezifisch alkylieren (112). Wegen ihrer hohen Dichte an nucleophilen Gruppen wird jedoch die DNA als Zielmolekül bevorzugt dienen, weil hierbei außer dem Zuckerphosphat-Grundgerüst auch die Heteroatome der Basen angegriffen werden können, besonders N-7 von Guanin (113,114).

Entscheidend für die alkylierende Aktivität einer Substanz ist dabei die Zahl der alkylierenden Gruppen pro Molekül. Bifunktionelle Alkylantien wirken schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen cytotoxisch als ihre analogen monofunktionellen (115). Ihre Wirkung üben sie über drei verschiedene Möglichkeiten der Quervernetzung aus: DNA- DNA (inter- und intramolekular), DNA- RNA und DNA- Protein (116,117).

Treten bei Substanzen mit gleicher alkylierender Aktivität, wie sie bei bifunktionellen Nor-N-Lost-Verbindungen zu erwarten sind, Abweichungen in ihren cytostatischen Wirkungen auf, so kann dies an unterschiedlichen Transportmechanismen in die Zelle liegen. GOLDENBERG und Mitarbeiter wiesen nach, daß die Permeation von N-Lost selbst über denselben aktiven Transportmechanismus wie bei Cholin erfolgt (118,119). Bei

Phenylalanin-Lost ließ sich zeigen, daß es über das Transportsystem der neutralen Aminosäuren in Tumor-Zellen eingeschleust wird (120). Seine Cytotoxizität ließ sich durch Zugabe größerer Konzentrationen an neutralen Aminosäuren ins Medium hemmen (121).

Die schneller ausgebildeten Hemmeffekte des N^{α},N^{ω}-Bis-(2-chlorethyl)-Arg im Vergleich mit den bischlorethylierten Aminosäuren Gly und Phe könnten demnach auf zwei Faktoren beruhen: zum einen wird das basische Arg-Derivat über einen anderen, schnelleren Transportweg in die Zelle eingeschleust als die neutralen Gly- und Phe-Derivate, zum andern kann die zusätzliche Affinität der Guanidino-Gruppe zu den Phosphatgruppen der DNA einen beschleunigenden Einfluß ausüben.
Die Verzögerung in den cytostatischen Effekten der bischlorethylierten Dipeptide Gly-Arg und Phe-Arg ist eher in der Tatsache zu suchen, daß der Eintritt der alkylierenden Gruppen in die Zelle erst nach Abspaltung des Arg in Form der resultierenden chlorethylierten Gly- und Phe-Derivate erfolgt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden zwei Typen von Verbindungen synthetisiert:

I. ω-Guanidinocarbonsäureverbindungen und Analoge:

4-Guanidinobutyryl-phenylalanindimethylamid

5-Guanidinovaleryl-phenylalanindimethylamid

6-Guanidinohexanoyl-phenylalanindimethylamid

11- Guanidinoundecanoyl-phenylalanindimethylamid

1-Guanidino-3-phenylpropan

1-Guanidino-4-phenylbutan

Arginyl-glycyl-phenylalanyl-phenylalanyldimethylamid

II. N,N-bischlorethylierte Aminosäuren und Dipeptide:

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycin

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanin

N^{α},N^{α}-Bis-(2-chlorethyl)-arginin

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-glycyl-arginin

N,N-Bis-(2-chlorethyl)-phenylalanyl-arginin

Die Verbindungen des Typs I werden in insulinempfindlichen Systemen auf biologische Effekte untersucht. Als Testsysteme dienen die Bestimmung der Glucose-Oxydation in isolierten Zellen des epididymalen Fettgewebes der Ratte, die in-vivo-Messung der ^{14}C-Aktivität in Diaphragma und Fettgewebe von Mäusen sowie eine Blutglucose-Bestimmung nach intraperitonealer Injektion der Verbindungen mit radioaktiv markierter Glucose.

Es zeigte sich, daß 1-Guanidino-3-phenylpropan in allen Testsystemen signifikante Effekte aufwies, ebenso 1-Guanidino-4-phenylbutan mit Ausnahme der Blutglucose-Senkung. Bei der

Glucose-Oxydation zeigten sie das für arginylfreie Guanidinoverbindungen charakteristische antagonistische Verhalten zu Insulin.

Von den an Phenylalanindimethylamid gekoppelten ω-Guanidinocarbonsäuren ließen sich nur bei 5-Guanidinovaleryl- und 6-Guanidinohexanoyl-Phe-$N(CH_3)_2$ für die ^{14}C-Aufnahme in Muskel und Fettgewebe Effekte nachweisen. Gleiches Verhalten war beim Tetrapeptid zu beobachten. In den anderen Testsystemen verhielten sie sich indifferent.

Die Verbindungen des Typs II werden in EHRLICH-Ascites-Zellsuspensionen auf cytostatisches Verhalten untersucht.

Alle bischlorethylierten Verbindungen zeigten gleiche alkylierende Aktivitäten. Die cytotoxischen Effekte waren beim N^{α},N^{α}-bis-(2-chlorethyl)-Arg aufgrund der basischen Guanidinogruppe im Vergleich zu den entsprechenden neutralen Derivaten des Gly und Phe beschleunigt. Im Gegensatz dazu wiesen die bischlorethylierten Dipeptide in ihrem cytotoxischen Verhalten eine gewisse Verzögerung auf. Es wurde geschlossen, daß der Transport der alkylierenden Gruppen in die Zelle erst nach Abspaltung des Arg erfolgt.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1) Pauling, L. (1973), "Die Natur der chemischen Bindung", Weinheim, 272

2) Schneider, F. (1978) Naturwissenschaften 65, 376 - 381

3) Riordan, J.F., McElvany, K.D., Borders, Jr. (1977) Science 195, 884 - 889

4) Watanabe, C.K. (1918) J. Biol. Chem. 33, 253 - 265

5) Frank, E. (1927) Naturwissenschaften 15, 213 - 215

6) Butterfield, W.J.H., Cox, B.D., Whichelow, M.J. 4. Annu. Meet. Eur. Assoc. Study of Diabetes, Louvain Juli 1968

7) Weitzel, G. (1950) Dtsch. Med. Wochenschr. 75, 1616 - 1620

8) Creutzfeld, W., Söling, H.D. (1960) Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk. 15, 1 - 10

9) Schwegler, F. (1971) Biochem. Dissertation, Universität Tübingen

10) Weitzel, G., Fretzdorff, A.M., Stock, W. (1980) Z. Physiol. Chem. 361, 41 - 50

11) Weitzel, G., Renner, R., Guglielmi, H. (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 535 - 539

12) Weitzel, G., Stock, W., Guglielmi, H. (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 1661 - 1670

13) Weitzel, g., Renner, R., Guglielmi, H. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1617 - 1630

14) Grande, P.U. (1976) Biochem. Dissertation, Universität Tübingen

15) Wolf-Pavlović, E. (1976) Biochem. Dissertation, Universität Tübingen

16) Weitzel, G., Schaeg, W., Willms, B., Boden, B. (1965) Ann. 698, 248 - 258

17) Weber, U., Schneider, F., Köhler, R., Weitzel, G. (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 947 - 949

18) Weber, U., Hörnle, S., Griese, G., Herzog, K.H., Weitzel, G. (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 1715 - 1717

19) Weber, U., Hörnle, S., Köhler, P., Nagelschneider, G., Weitzel, G. (1968) Z. Physiol. Chem. 349, 521 - 541

20) Weitzel, G., Weber, U., Eisele, K., Zollner, H., Martin, J. (1970) Z. Physiol. Chem. 351, 263 - 267

21) Weitzel, G., Weber,U., Martin, J., Eisele, K. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1005 - 1013

22) Weitzel, G., Eisele, K., Guglielmi, H., Stock, W., Renner, R. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1735 - 1738

23) Weitzel, G., Eisele, K., Schulz, V., Stock, W. (1973) Z. Physiol. Chem. 354, 321 - 330

24) Cotton, F.A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 481, 1-10

25) Borders, C.L., Riordan, J.F., Auld, D.S. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 490 - 496

26) Armstrong, V.W., Sternbacg, H., Eckstein, F. (1976) FEBS Lett. 70, 48 - 51

27) Meyer, V. (1887) Ber. 20, 1729 - 1731

28) Ehrlich, P. (1898) Über die Beziehungen von chemischer Constitution, Verteilung und pharmakologischer Wirkung In: Himmelwelt, F. (Hrsg.) (1965) The collected papers of Paul Ehrlich, vol.I, 570 - 595

29) Reich, S.D. (1981) In: "Cancer and Chemotherapy", Vol. III, 61 - 77

30) Ross, W.C.J. (1974) In: "Handbook of Experimental Pharmacology: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents" (Sartorelli, A.C., Johns, D.G., Hrsg) Vol. 38, Part I 33 - 51, Berlin, New York

31) Bergel, F., Stock, J.A. (1953) Rep. Brit. Emp. Cancer Campgn., 31, 6 - 14

32) Bergel, F., Stock, J.A. (1954) J. chem. Soc. 2409

33) Larionov, L.F., Khoklov, A.S., Shkodinskaja, E.N., Vasina, O.S., Troosheikina, V.I., Novikova, M.A. (1955) Lancet ii, 169 - 187

34) Luck, J.M. (1956) Science 123, 984 - 998

35) Stock, J.A. In: CIBA-Foundation Symposium (1958) Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity 89 - 103

36) Seliger,H. (1956) Krebsarzt 11, 342

37) Izumi, M. (1954) Pharmac. Bulletin of Japan 2, 275 - 279

38) IUPAC - IUB (1966) J. Biol. Chem. 241, 2491 - 2495

39) IUPAC - IUB (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 245 - 261

40) Stahl,E. Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl. Berlin-Heidelberg- New York, 1973

41) Hochschild, E. (1976) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen

42) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Fa. Merck, Darmstadt

43) Friedmann, O.M., Boger, E. (1961) Analytical Chemistry 33, 907 - 910

44) Brenner, M., Huber, W., (1953) Helv. Chim. Acta 36I, 1109 - 1115

45) Joos, T.F. (1975) Biochem. Diplomarbeit, Universität Tübingen

46) Wieland, T., Bernhard, H. (1951) Liebigs Ann. Chem. 572, 190 - 194

47) Boisonnas, R.A. (1951) Helv. Chim. Acta 34, 874 - 879

48) Vaughn, J.R. (1952) J. Amer. Soc. 73, 3547

49) Vaughn, J.R., Osato, R.C. (1952) J. Amer. Soc. 74, 676 - 678

50) Albertson, N.F. Synthesis of Peptides with Mixed Anhydrids, J. Wiley & Sons, Inc., London/New York 1962, Bd. 12, S. 157

51) Kapfhammer, J., Müller, H. (1941) Helv. Chim. Acta 24, 645

52) Vithayathil, P.J., Richards, F.M. (1960) J. Biol. Chem. 235, 1029 - 1045

53) Habeeb, A.F.S.A. (1960) Canad. J. Biochem. Physiol. 38, 493 - 498

54) Hardy, P.M. (1969) J. Chem. Soc. B 66, 491

55) Sheehan, J.C., Hess, G.P. (1955) J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 - 1068

56) Sheehan,, J.C., Goodman, M., Hess, G.P. (1956) J. Amer. Che. Soc. 78, 1367 - 1369

57) Boisonnas, R.A., Guttmann, S., Jaquenoud, P.A., Sandrin, E., Waller, J.P. (1961) Helv. Chim. Acta 44, 123 - 130

58) König, W., Geiger, R., Peptides 1969, Proceedings of the 10th European Peptide Symposium, Abano Terme, Italy 1969 North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1971, S. 17

59) König, W., Geiger, R. (1972) Chemistry and Biology of Peptides (J. Meienhofer Hrsg.), Ann Arbor Science Publishers, 343 - 350

60) König, W., Geiger, R. (1973) Chem. Ber. 106, 3626 - 3635

61) Jäger, G., König, W., Wissmann, H., Geiger, R. (1974) Chem. Ber. 107, 215 - 231

62) Weygand, F., Hoffmann, D., Wünsch, E. (1966) Z. Naturf. 21b, 426 - 428

63) Wieland, T., Bernhard, H. (1951) Liebig's Ann. Chem. 572, 190 - 194

64) Strecker, A. (1854) Liebig's Ann. Chem. 91, 349

65) Knoevenagel, E. (1904) Chem. Ber. 37 4073 - 4094

66) Organikum, 10. Auflage, 1971, S. 213

67) Bergmann, M., Zervas,L., Rinke, H. (1934) Z. Phys. Chem. 224, 40

68) Zervas, L., Winitz, L. Greenstein, J.P. (1957) J. Org. Chem. 27, 1515 - 1521

69) Weygand, F., Hunger, K. (1962) Chem. Ber. 95, 1 - 6

70) Weygand, F., Nintz, E. (1965) Zeitschr. f. Naturf. 20 b, 429 - 433

71) Martini, O., Hahn, J. (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 1461 - 1476

72) Jeanrenaud, B., Renold, A.E. (1959) J. of Biol. Chem. 234, 3082 - 3087

73) Leonards, J.R., Laudan, B.R. (1960) Arch. Biochem. Biophys. 91, 194 - 200

74) Rafaelsen, O.J., Lauris, V., Renold, A.E. (1965) Diabetes 14, 19 - 27

75) Clausen, T. (1965) Acta Endocrinologia 50, 115 - 122

76) Partamian, J., Rasia, E., Cahill, G.F.Jr. (1966) Metabolism, 15, 70 - 75

77) Sovik, O. (1966) Acta Physiol. Scand. 68, 246 - 254

78) Kaplan, N.O. in: Methods in Enzymology, Vol.3, 117 Academic Press, New York (1957)

79) Huggett, A.S.G., Nixon, D.A. (1957) Lancet II, 368

80) Weitzel, G., Schneider, F., Fretzdorff, A.M., Durst, J., Hirschmann, W.D. (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 433 - 442

81) König, W., Geiger, R. (1970) Chem. Ber. 103, 788 - 798

82) Caprino, L.A., (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 98 - 101

83) Anderson, G.W., McGregor, A.C. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180

84) Schnabel, E. (1967) Liebig's Ann. Chem. 702, 188 - 196

85) Hôfmann, K., Peckham, W.D., Rheiner, A. (1956) J. Amer. Chem. Soc. 78, 238

86) Gibian, H., Schröder, E. (1961) Liebig's Ann. Chem. 642, 145

87) Chen, R.F. (1957) J. Biol. Chem. 242, 173 - 181

88) Rodbell, M. (1964) J. Biol. Chem. 239, 375 - 380

89) Heptner, W., Christ, O. (1967) Diabetologia 3, 443 - 448

90) Gliemann, J. (1967) Diabetologia 3, 382 - 388

91) Gliemann, J. (1965) Diabetes 14, 643 - 649

92) Bergmann, M., Zervas, L. (1932) Ber. Dt. Chem. Ges. 65, 1192 - 1201

93) Wieland, Th. in: Houben-Weyl, Methoden der org. Chemie XI,2, 269 - 509 (1958)

94) Waley, S.G., Watson, J. (1953) J. Chem. Soc. 475 - 479

95) Ben-Ishai, D. (1954) J. Org. Chem. 19, 62 - 69

96) Habeeb, A.F.S.A. (1971) Immunochemistry 8, 1047

97) McKay, F.C., Albertson, N.F. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686 - 4690

98) Knorr, L. (1897) Chem. Ber. 30, 909 - 913

99) Zimakov, P.V., Kogan, L.M. (1958) Z. prikl. Chim. 31, 613

100) Stroh, R. in: Houben-Weyl, Methoden der org. Chemie V,3 S. 862

101) Knoevenagel, E. (1904) Chem. Ber. 37, 4073

102) Wurtz, A. (1860) J. Liebig's Ann. Chem. 114, 52 - 63

103) Fraenkel-Conrat, H. (1944) J. Biol. Chem. 154, 227 - 238

104) Möller, F. in: Houben-Weyl, Methoden der org. Chemie IX,1 S. 311 - 312

105) FIAT Final Rep. (1946) 845, 2

106) Knorr, E. (1899) J. Liebig's Ann. Chem. 307, 199 - 206

107) Henecka, H. in: Houben-Weyl, Meth. d. org. Chemie VIII S. 467 - 479 (1952)

108) Colvin, M. in: Cancer and Chemotherapy Vol. III S.287 - 302 (1981) New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco

109) Kikuchi, K., Larner, J. Freer, R.J.,Day, A.R., Morris, H., Dell, A., Marshall, S., Olefsky, J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9281 - 9288

110) Kikuchi, K., Larner, J., Freer, R.J., Day, A.R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9441 - 9444

111) Kikuchi, K., Larner, J., Freer, R.J., Day, A.R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9445 - 9449

112) Colvin, M., Brundrett, R.E., Kan, M.-N.N., Jardine, I., Fenselau, C. (1976) Cancer Res. 36, 1121 - 1126

113) Loveness, A. (1969) Nature 223, 206 - 207

114) Gerchman, L.L., Ludlum, D.B. (1973) Biochim. Biophys. Acta 308, 310 - 316

115) Haddow, A., Kon, G.A.R., Ross, W.C.J. (1948) Nature 162, 824 - 828

116) Rutman, R.J., Steele, W.J., Price, C.C. (1961) Cancer Res. 21, 1134 - 1140

117) Klatt, O., Stehlein, J.S., McBride, C., Griffin, A.C. (1969) Cancer Res. 29, 286 - 290

118) Goldenberg, G.J., Vanstone, C.L., Bihler, I. (1971) Science 172, 1148 - 1149

119) Goldenberg, G.J. (1974) Cancer Res. 34, 2511 - 2516

120) Goldenberg, G.J., Lee, M., Lam, H.-Y.P., Begleiter, A. (1977) Cancer Res. 37, 755 - 760

121) Vistica, D.T., Toal, J.N., Rabinovitz, M. (1977) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 18, 26

Lebenslauf

Am 24. Dezember 1942 wurde ich als Sohn des Berthold Hochschild und dessen Ehefrau Gertrud in Karlsruhe geboren.
Meine Jugend verbrachte in Berghausen bei Karlsruhe. Dort besuchte ich die Grundschule, wechselte nach 4 Jahren in die Mittelschule nach Karlsruhe-Durlach über, wo ich nach einem weiteren Jahr in das dortige Markgrafen-Gymnasium eintrat. Im März 1963 legte ich das Abitur ab.
Vom Sommersemester 1963 bis zum Sommersemester 1964 war ich an der Technischen Hochschule Karlsruhe für das Studienfach Chemie immatrikuliert. Im Wintersemester 1964/65 begann ich mit dem Studium der Biochemie am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen. 1966 legte ich den ersten und 1972 den zweiten Teil des Vordiploms ab. Die Diplomhauptprüfung folgte im Frühjahr 1975.
Vom August 1975 bis September 1976 fertigte ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Weitzel meine Diplomarbeit an mit dem Thema: " Synthese von atypischen Tripeptiden aus der Insulinsequenz B 22-24 ".
Von Februar 1977 bis September 1982 arbeitete ich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Weitzel an der vorliegenden Dissertation zum Thema: " Synthese und biologische Effekte substituierter Guanidinoverbindungen: insulinähnliche Wirkungen und cytostatische Eigenschaften".

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren:

Physiologische Chemie:	G. Weitzel, F. Schneider, H. Guglielmi
Organische Chemie:	E. Müller, E. Bayer
Anorganische Chemie:	W. Rüdorff, W. Bues
Physikalische Chemie:	G. Kortüm, H. Mauser
Physikalische Biochemie:	K. Wegmann
Physik:	H. Krüger
Mathematik:	W. Schweizer
Mikrobiologie:	H. Zähner
Botanik:	H. Metzner, E. Bünning
Zoologie:	K.G. Grell, H. Möhres
Anatomie:	K. Mörike
Medizinische Strahlenkunde	U. Feine, E. Kallée